

Zeitaufgelöste und molekulare Photophysik

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

von

Dipl. Phys. Tobias Staut

Saarbrücken

2018

Tag des Kolloquiums: 31.10.2018

Dekan: Prof. Dr. Guido Kickelbick

Berichterstatter: Prof. Dr. Gregor Jung

Prof. Dr. Marc Schneider

Vorsitz: Prof. Dr. Michael Springborg

Akad. Mitarbeiter: Dr. Elke Neu-Ruffing

„We are stuck with technology when what we really want is just stuff that works.“

Douglas Adams, aus der posthumen Veröffentlichung *The Salmon of Doubt*.

Abstract

In der vorliegenden Arbeit wurden mit verschiedenen Methoden der zeitaufgelösten Spektroskopie molekulare Parameter verschiedener Farbstoffe aufgeklärt. Mit Hilfe von zwei-photonenangeregter Fluoreszenzanisotropie konnte gezeigt werden, dass der $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergangstensor von Terrylen nicht rein totalsymmetrisch ist, da er Nebendiagonalelemente beinhaltet. Merocyanin 540 wurde mit zeitaufgelöster Doppelresonanzspektroskopie untersucht. Die beobachtete intensitätsabhängige Effizienz der Fluoreszenzlöschung weist auf transiente Zweiphotonenanregung hin.

Für das Doppelresonanzexperiment wurde ein Messmodus programmiert, der die Untersuchung von – photophysikalisch gesehen – langsamen Prozessen wie Phosphoreszenz und Triplettquenching ermöglichen soll. Für diesen Modus geeignete Farbstoffe zeigen reversed intersystem crossing (RISC), sie kehren also nach transienter Anregung aus dem Triplettzweig in den Singulettzweig zurück. Die an Merocyanin durchgeführten Experimente litten unter der geringen Quantenausbeute des RISC. Zur Überwindung der experimenteller Hindernisse werden hard- und softwareseitige Verbesserungen vorgeschlagen.

The present work employs different time-resolved spectroscopic methods on several fluorophores to ascertain some of their molecular parameters. Two-photon excited fluorescence anisotropy revealed off-diagonal elements in the $S_0 \rightarrow S_2$ transition tensor of Terrylene, ruling out a totally symmetric transition. Merocyanine 540 was examined using time-resolved double resonance spectroscopy. The intensity dependent efficiency of the fluorescence depletion hints to a transient two-photon excitation.

The double resonance experiment includes a measurement mode programmed to examine phosphorescence and triplet quenching, phenomena which are slow compared to photophysical timescales. Suitable fluorophores are capable of reversed intersystem crossing (RISC), meaning they return to the singlet branch upon transient excitation in the triplet branch. The experiments conducted on Merocanine suffered from a low RISC quantum yield. In order to overcome experimental obstacles, improvements on hard- as well as software are recommended.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Zeitaufgelöste Doppelresonanzspektroskopie	3
2.2	Zeitaufgelöste 2PE-Fluoreszenzanisotropie	11
3	Experimenteller Teil	23
3.1	Probenpräparation	23
3.2	UV-VIS- und Fluoreszenzspektroskopie	24
3.3	Zeitaufgelöste Doppelresonanzspektroskopie	25
3.4	Zeitaufgelöste 2PE-Fluoreszenzanisotropie	38
4	Ergebnisse und Diskussion	45
4.1	UV-VIS- und Fluoreszenzspektroskopie	45
4.2	Zeitaufgelöste Doppelresonanzspektroskopie	46
4.3	Zeitaufgelöste 2PE-Fluoreszenzanisotropie	63
A	Ergänzende Abbildungen und Tabellen	73
A.1	Experimentvorbereitung	73
A.2	UV-VIS- und Fluoreszenzspektren	80
A.3	Stationäre Tieftemperaturanisotropiespektren	91
A.4	Zeitaufgelöste Doppelresonanzspektroskopie	95
A.5	Zeitaufgelöste 2PE-Fluoreszenzanisotropie	98
	Literatur	103

1. Einleitung

Joseph Lakowicz stellt in seinem Buch „Principles of Fluorescence Spectroscopy“ sinngemäß fest, dass die Methoden der Fluoreszenzspektroskopie und der zeitaufgelösten Detektion die dominierenden Werkzeuge der biophysikalischen Wissenschaften sind. Mit ein Grund dafür ist die enorme Sensitivität der Fluoreszenz, demonstriert durch die Verortung einzelner Moleküle. Dies ermöglichen Mikroskopiemethoden, mit denen die Abbe’sche Auflösungsgrenze durchbrochen wird.[1–4] Ein weiterer ist die enorme Flexibilität in der Anwendung, sodass sich zu jeder Fragestellung mindestens eine experimentelle Technik zu deren Untersuchung findet. Beispielhaft hierfür ist die Untersuchung des Triplettzustandes, die zunächst über die herausfordernde Messung der Phosphoreszenz realisiert wurde.[5] Vor 10 Jahren dann wurde mit dem transient state (TRAST) imaging die Beobachtung solcher transienten Zustände auf die Messung der Fluoreszenz zurückgeführt.[6, 7]

Von zentraler Bedeutung für die Arbeit ist die 1931 vorausgesagte[8] Zweiphotonenanregung (2PE). Sie wurde nach der Entwicklung des Lasers[9] 1960 im Jahr darauf erstmals an $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ nachgewiesen[10]. In den letzten 55 Jahren hat die 2PE mit zum Erfolg der Fluoreszenzspektroskopie in vielen Anwendungsgebieten beigetragen.[11–13][14, Kap. 18] In Verbindung mit zeitaufgelöster Anisotropiespektroskopie[15–19] lässt sich der 2PE-Übergangstensor bestimmen. Die Theorie dazu wurde von Ryderfors, Mukhtar und Johansson umfassend behandelt.[20–23] Abschnitt 2.2.3 rekapituliert die Entwicklung des dafür zu lösenden Gleichungssystems (2.40).

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der intrinsischen Dynamik fluoreszierender Moleküle. Ihre Eigenschaften werden maßgeblich von nichtstrahlenden Prozessen bestimmt, die zwischen Anregung und Emission bzw. in Konkurrenz dazu ablaufen.[24] So verursacht die Schwingungsrelaxation (SR) eine Gesetzmäßigkeit, die als Kasha’s Regel bekannt ist:[25] Der emittierende Zustand bei gegebener Multiplizität¹ ist der am wenigsten angeregte Zustand im Zweig gleicher Multiplizität. Die Regel wird nur selten gebrochen, etwa wenn die vibronische Kopplung der angeregten Zustände für eine Schwingungsrelaxation nicht ausreicht.[26] In der Regel ist das Fluoreszenzemissionsspek-

¹Die Multiplizität ist eine Eigenschaft des Gesamtelektronenspins eines Moleküls und beschreibt die Anzahl energetisch entarteter (Spin)zustände. Die Multiplizität des Singulettzweigs ist eins, die des Triplettzweigs drei etc.

trum eines Farbstoffs unabhängig von der Anregungswellenlänge. Darüber hinaus existieren Konkurrenzprozesse zur Photonenemission wie interne Konversion (IC), welche die Fluoreszenzquantenausbeute reduzieren.[27]

In ihrer Zeitentwicklung lassen sich auch nichtstrahlende Prozesse spektroskopisch untersuchen, da sie die Besetzung der abgefragten Zustände ändern. Ein vielseitiges Werkzeug dazu ist die Doppelresonanzspektroskopie, mit der jeweils ein elektronisch angeregter Zustand abgefragt werden kann.[28] Mit durchstimmbaren Lasern kann die Anzahl der überprüfbar Zustände in sequentieller Messung gesteigert werden. Eine neuere Entwicklung ist die gleichzeitige Beobachtung vieler angeregter Zustände mit Superkontinua.[29, 30]

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Für den ersten Teil wurde ein Doppelresonanzexperiment aufgebaut und hinsichtlich seiner Leistungsfähigkeit bewertet. Mit dem Messaufbau soll es möglich sein, orts aufgelöste Doppelresonanzspektroskopie auf zwei verschiedenen Zeitskalen zu betreiben. Dafür sind zwei Messmodi notwendig, einer davon besitzt eine Zeitauflösung im Nanosekundenbereich. Die angestrebte Anwendung dieses Modus ist die ortsabhängige Untersuchung der Reaktionsgeschwindigkeit des ESPT. Darüber hinaus wurde eigens ein Messmodus programmiert, der die Untersuchung von – photophysikalisch gesehen – langsamen Prozessen wie Phosphoreszenz und Triplettquenching ermöglichen soll. Hiermit soll der lokale Sauerstoffgehalte biologischer Proben durch orts aufgelöstes RISC bestimmt werden.

Im zweiten Teil wird mit Hilfe von Anisotropiemessungen der 2PE-Übergangstensor von Terrylen bestimmt. Zuvor wird das Gleichungssystem ermittelt, mit dessen Hilfe die empirischen Parameter der zeitaufgelösten Anisotropie auf die molekularen Tensorelemente zurückgeführt werden können.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Zeitaufgelöste Doppelresonanzspektroskopie

2.1.1. Doppelresonanzspektroskopie

Der Begriff Doppelresonanz wird üblicherweise mit der hochauflösenden Atom- und Molekülspektroskopie in Zusammenhang gebracht. Es existieren verschiedene Verfahren, die zur Aufklärung von (Hyper)Feinstrukturniveaus oder Rotationsstrukturen dienen.[28, 31] Den Techniken ist gemeinsam, dass zwei zu verschiedenen Übergängen resonante elektromagnetische Wellen die Probe anregen. Eine davon, die Pumpe, soll die Probe in einen bestimmten Zustand präparieren. Die andere wird Abfrage genannt und liest den Zustand aus. Liegen die Frequenzen beider Strahlen im optischen Bereich, handelt es sich um optisch-optische Doppelresonanz, die kurz Doppelresonanzspektroskopie (DRS) genannt wird.

Im Allgemeinen werden die drei in Abb. 2.1 dargestellten Arten der DRS unterschieden. Erstens der „V-Typ“, bei dem Pumpe und Abfrage am selben elektronischen Zustand Übergänge auslösen. Eine Anwendung, die auf diesem Prinzip beruht, ist das spektrale Lochbrennen (spectral hole burning, SHB).[32] SHB ermöglicht spektrale Auflösung unterhalb der inhomogenen Linienbreite des untersuchten Ensembles. Damit eignet es sich, um Hyperfeinstrukturniveaus in Atomen zu identifizieren oder die Größe von an Photosynthese beteiligten Komplexen zu bestimmen.[33, 34]

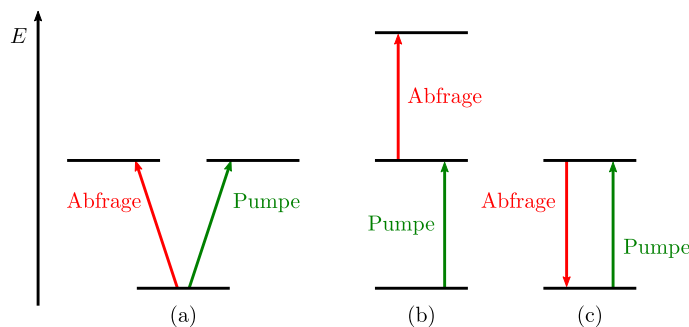


Abbildung 2.1.: Einfache schematische Darstellung von (a) V-Typ Doppelresonanz, (b) Pump-Probe-Spektroskopie und (c) Pump-Dump-Spektroskopie.

Die Abfrage der anderen beiden Methoden löst Übergänge am gepumpten Niveau aus. Werden dabei noch energiereichere Niveaus besetzt, handelt es sich um Pump-Probe-Spektroskopie. Die Löschung der Besetzung des angeregten Niveaus durch stimulierte Emission heißt Pump-Dump-Spektroskopie.

Die Zustände der angeregten Moleküle verändern sich mit der Zeit, und so kann die stufenweise Anregung auch aus anderen transienten Niveaus erfolgen. Variante (b) in Abb. 2.1 heißt daher auch transiente Absorption (transient state absorption, TRAST), und wird zur Untersuchung von cis-trans-Isomerie, Elektronentransfer und Energietransferprozessen eingesetzt.[7, 35, 36]

Die derzeit bedeutendste Anwendung des Pump-Dump-Prinzips (Abb. 2.1 (c)) ist die auflösungsgrenzendurchbrechende STED-Mikroskopie (stimulated emission depletion). [1, 4, 37]

Ist der Abfragelaser weit genug durchstimmbar oder liefert ein entsprechend breites Kontinuum, sind STED und TRAST im selben Experiment nachweisbar.[38] Im diesem Fall kann der Nachweis von Übergängen durch differentielle Absorption erfolgen, bei der aus der Differenz zwischen Probenextinktion mit und ohne Pumpe entstehende und verschwindende Übergänge bzw. stimulierte Emission abgelesen werden können.[39] Bei der Doppelresonanz im Wortsinne, also Experimenten mit zwei Lasern fester Frequenz, werden Übergänge über Fluoreszenz nachgewiesen. Gegenüber Absorptionsmethoden hat die Fluoreszenz den Vorteil einer deutlich höheren Empfindlichkeit. Sie wird durch die Unterdrückung des Anregungslichtes und der Verwendung von Einzelphotonendetektoren erreicht.[14, Kap. 2] Damit eignet sich auch zur direkten Messung schwach emittierender Prozesse einschließlich der Phosphoreszenz.[40]

2.1.2. Zeitauflösung

In Pump-Probe- und Pump-Dump-Experimenten kann das fluoreszierende Niveau durch die Pumpe oder die Abfrage besetzt werden. Die Messung der Fluoreszenzintensität $F(t_d)$ in Abhängigkeit der Verzögerung t_d zwischen Pumpe und Abfrage ergibt einen exponentiellen Kurvenverlauf. Abhängig von der Zeitauflösung des Experiments, dem Messbereich und der Moleküldynamik wird die Besetzung oder die Entvölkerung beobachtet.[41] $F(t_d)$ bezeichne das zeitintegrierte Fluoreszenzsignal eines einzelnen Pump-Probe-Zyklus.

Wie bei TCSPC-Messungen (time-correlated single photon counting[42]) müssen für eine aussagekräftige Statistik viele Zyklen aufgenommen werden.² Stellt sich durch die Doppelre-

²Die Emission eines einzelnen Photons erfolgt zufällig, mit einer zeitabhängigen Wahrscheinlichkeit. Die experimentell erhaltene Photonverteilung tendiert dazu, mit zunehmender Anzahl registrierter Photonen die Form dieser Wahrscheinlichkeitsverteilung anzunehmen. Dies ist als „Gesetz der großen Zahlen“ verallgemeinert.[43]

sonanz ein dynamisches Gleichgewicht ein, so wird die mittlere Fluoreszenzzählrate $\Delta F(t_d)/\Delta t$ gemessen. Wird explizit die Zustandsentwicklung nach dem Abfragepuls beobachtet, ist der geeignete Parameter die Summe von Einzelzyklusmessungen $\sum F(t_d)$ (vgl. Abschnitt 4.2.3). Die zeitabhängige Fluoreszenz einer Farbstofflösung der Konzentration $c(\mathbf{r})$ wird in einem spektrometrischen Aufbau mit der räumlichen Sammeffizienz $RSE(\mathbf{r})$ und der spektralen Sammeffizienz $SSE(\lambda)$ aufgenommen.[44] Der besetzte Zustand N fluoresziert mit isotroper Ratenkonstante und Lebensdauer – $k_f \neq k_f(\mathbf{r})$ und $\tau_N \neq \tau_N(\mathbf{r})$ – sodass $N(\mathbf{r}, t) = N(\mathbf{r}) \times N(t)$. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz $F(t)$ aus N ist damit

$$F(t) = \int dV \int d\lambda RSE(\mathbf{r}) \times SSE(\lambda) \times c(\mathbf{r}) \times k_f \times N(\mathbf{r}, t). \quad (2.1)$$

Der ortsabhängige Teil von (2.1) kann zum Gesamteffizienzfaktor q zusammengefasst werden, sodass für den zeitabhängigen Teil

$$F(t) = q \times k_f \times N(t) \quad (2.2)$$

gilt. Die Fluoreszenzintensität

$$F(t_d) = \int_0^{t_{end}} dt q \times k_f \times N(t) \quad (2.3)$$

hängt vom Zeitverlauf der Besetzung des untersuchten Zustandes und damit von der Art des Experiments und dem untersuchten Farbstoff ab. Aufgrund der Vielzahl an beteiligten Zuständen und Übergängen ist die Besetzung des fluoreszierenden Zustandes $N(t)$ und damit $F(t_d)$ nicht trivial zu erhalten. Die gemessene Fluoreszenzintensität (2.3) ist in Abb. 2.2 durch die orange hinterlegten Flächen unter den Kurven von $S_1(t)$ bzw. $S'_1(t)$ gegeben.

Ein Weg, der $F(t_d)$ liefert, ist die numerische Lösung des Differentialgleichungssystems, das die Übergänge zwischen den beteiligten Zuständen beschreibt.[45, 46] Eine weitere Möglichkeit ist die Reduktion des Gleichungssystems auf dominante Beiträge.[47] Die Verringerung der freien Parameter senkt dabei das Risiko der Überanpassung an die Messwerte.[48, 49] Im Folgenden werden zwei Verläufe mit expliziten Näherungslösungen für $F(t_d)$ angegeben.

Abb. 2.2(a) zeigt die Pump-Dump-Spektroskopie am Beispiel des STED. Der Pumppuls $k_e(t)$ regt einen elektronischen Übergang in den S_1^* an. S_1^* steht für eine beliebige Schwingungsanregung im ersten elektronisch angeregten Zustand, S_1 für dessen Schwingungsgrundzustand. Der Dumpimpuls $k_s(t)$ leert den S_1 vollständig. Dies gilt unter zwei Voraussetzungen: zum einen muss λ_s mit der Emissionsbande des Farbstoffs überlappen, zum anderen muss der Puls

die Lebensdauer τ_{SR} angeregter Schwingungszustände überschreiten.[50, 51] $k_{SR} = 1/\tau_{SR}$ ist die Rate der Schwingungsrelaxation und k_{10} die Summe aller zum Zerfall von S_1 beitragenden Prozesse.

In Abb. 2.2(b) ist die Pump-Probe-Spektroskopie anhand eines beliebigen, durch $k_s(t)$ getriebenen Übergangs in einen fluoreszierenden Zustand S'_1 gezeigt. k_{10} muss keinen strahlenden Anteil enthalten, denn die Fluoreszenz k'_f wird beobachtet.

Unter der Annahme, dass $k_{SR} \gg k_{10}$ ist, lässt sich die Besetzung des S_1 durch k_{SR}

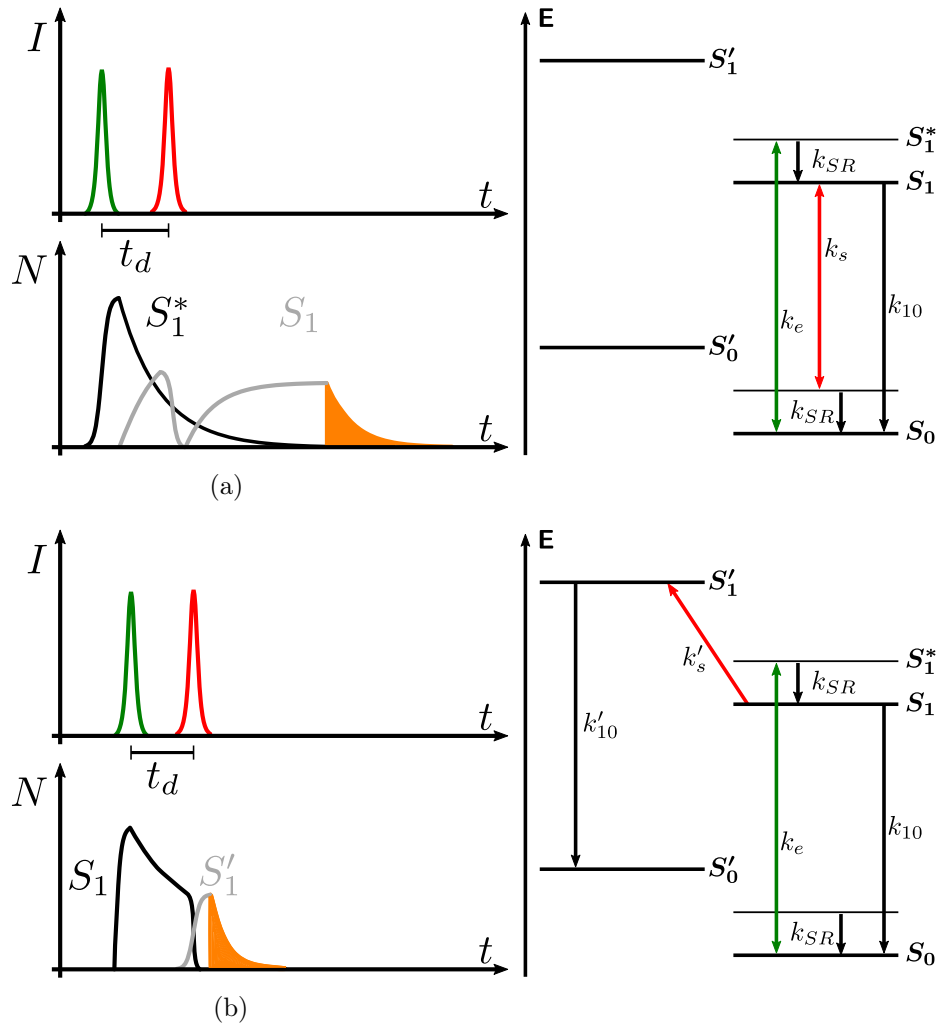


Abbildung 2.2.: (a) Die Pulsfolge der Pump-Dump-Spektroskopie löscht die Besetzung des S_1 . Der Fall $t_d < t_{SR}$ ist dargestellt.³

(b) Die Pulsfolge der Pump-Probe-Spektroskopie besetzt einen fluoreszierenden Zustand S'_1 . Gezeigt ist $t_d > t_{SR}$.

³Dieser Fall ist mit kurzen Pulsen ($\tau_{puls} \approx 10$ ps) auch für STED-Mikroskopie denkbar, vgl. [51]

Tabelle 2.1.: Die monoexponentielle Abhängigkeit der Fluoreszenz einfacher DRS-Szenarien.

	$F^{pd}(t_d)$, Pump-Dump	$F^{pp}(t_d)$, Pump-Probe
$t_d < t_{SR}$	$qN_0 \frac{k_f}{k_{10}} \exp(-k_{SR}t_d)$	$q'N_0 \frac{k'_f}{k'_{10}} \left(1 - \exp(-k_{SR}t_d)\right)$
$t_d > t_{SR}$	$qN_0 \frac{k_f}{k_{10}} \left(1 - \exp(-k_{10}t_d)\right)$	$q'N_0 \frac{k'_f}{k'_{10}} \exp(-k_{10}t_d)$

getrennt von dem Zerfall mit k_{10} behandeln. Daraus ergeben sich zwei Regime für die Zeitentwicklung der Fluoreszenz, $t_d < t_{SR}$ und $t_d > t_{SR}$, wobei $t_{SR} > \tau_{SR}$ die Zeit ist, nach der die Schwingungsrelaxation als abgeschlossen angesehen wird. $F(t_d)$ kann in vier Fälle unterschieden und angegeben werden.

Es ergeben sich die monoexponentiellen Kurven gemäß Tab. 2.1. Mit $N(t) = N_0 \exp(-k_{10}t)$ und $t_{end} = t_d$ folgt $F^{pd}(t_d > t_{SR})$ durch Einsetzen in (2.3). In den anderen Fällen wird (2.3) für $t_{end} \rightarrow \infty$ ausgewertet, da die Fluoreszenz vollständig gemessen wird. Der Unterschied liegt in der Besetzung $N_{start}(t_d)$, die von k_{10} bzw. k_{SR} bestimmt wird.

2.1.3. Anwendungen

Excited State Proton Transfer – ESPT

Photosäuren sind Moleküle, deren Säurestärke sich nach elektronischer Anregung signifikant erhöht.[52] Da der Protonentransfer von der Photosäure auf geeignete Akzeptoren nun verstärkt stattfindet, wird er als ESPT (excited state proton transfer) bezeichnet.[53]



Besonders interessant sind Photosäuren mit einem großen ΔpK_S . Zu den wichtigsten

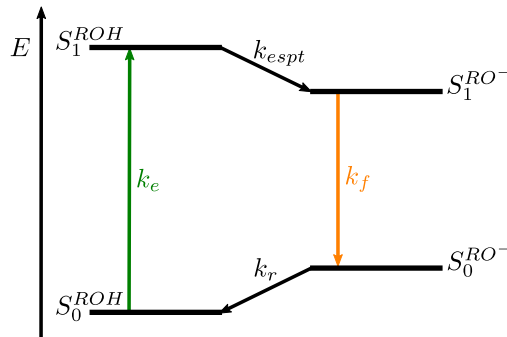
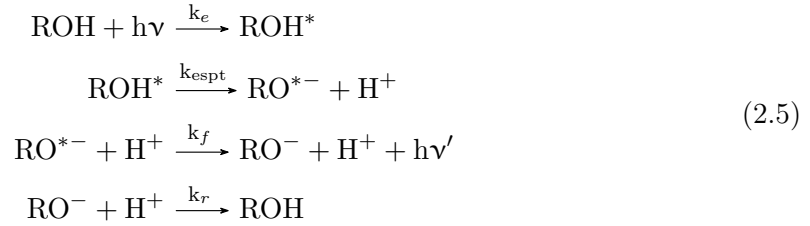


Abbildung 2.3.: Vereinfachter Försterzyklus einer Photosäure.

Vertretern gehören Pyrenderivate wie HPTS⁴ mit $\Delta pK_S \approx 6$. [54] In einer Lösung mit $pK_S^* \ll pH \ll pK_S$ liegt die Photosäure im Grundzustand praktisch vollständig protoniert vor, im elektronisch angeregten Zustand deprotoniert. Die Gleichgewichtsreaktionen (2.4) werden durch die Absorption und Emission in der jeweiligen Spezies verbunden, die nun einen Försterzyklus gemäß (2.5) und Abb. 2.3 durchlaufen.



Der Zyklus ermöglicht es, Protonentransfermechanismen zeitaufgelöst zu untersuchen, wobei in jüngerer Zeit das Verhalten in aprotischen Lösungsmitteln von besonderem Interesse ist. [55]

Wird die Zeitauflösung mittels DRS realisiert, handelt es sich methodisch um STED an der Photobase. In ein Regime gemäß Tab. 2.1 lässt sie sich jedoch nur schwer einordnen. Denn die Annahme, dass $k_{\text{espt}} \gg k_{10}$, ist aufgrund der enormen Vielfalt an Kombinationen von Lösemittel und Photosäure im Allgemeinen nicht gültig. [56] $F(t_d)$ für eine beliebige Photosäure kann durch die numerische Lösung des Differentialgleichungssystems (4.3) gefunden werden. Das Vorgehen wird in Abschnitt 4.2.1 besprochen.

Untersuchungen mit sub-Pikosekunden Pump-Probe-Spektroskopie haben bestätigt, dass der Protonentransfer in mehreren Zwischenschritten abläuft. [57] Der Reaktionsweg über intermediäre Ionenpaare wird Eigen-Weller-Schema genannt. [58, 59] Die in Pump-Probe-Experimenten nicht zugängliche Grundzustandsdynamik der Intermediate kann durch Antibunching in Korrelationsexperimenten untersucht werden. [60]

Reverse Intersystem Crossing – RISC

Elektronen sind Fermionen mit der Spinquantenzahl $s = \frac{1}{2}$. Die Gesamteigenfunktion aller Elektronen in Grundzustand eines Moleküls wird daher gemäß des Antisymmetrieprinzips aufgestellt. [61] Für einen insgesamt bindenden Zustand, ordnen sich die Elektronen so in die Molekülorbitale, dass die Spineigenfunktion antisymmetrisch ist. [62] Dementsprechend ist sie eindeutig, der Gesamtspin ist $S = \sum_i s_i = 0$ und das Molekül befindet sich im sogenannten Singulettzustand. Werden Elektronen auf energetisch entartete Orbitale verteilt, sodass diese nicht vollständig besetzt werden, liegt der Zustand mit Gesamtspin $S = 1$ aufgrund des Austauschterms energetisch niedriger. [63] Diesen Triplettzustand nimmt z.B. Sauerstoff im Grundzustand ein ($^3\text{O}_2 (^3\Sigma_g^-)$).

⁴8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonat

Gewöhnlich befindet sich der energetisch niedrigste Zustand im Molekül im Singulettzweig und wird mit S_0 bezeichnet. Der niedrigste elektronisch angeregte Zustand ist dann – begründet durch den Austauschterm – der erste angeregte Triplettzustand T_1 . Ein Kreuzen zwischen dem Singulett- und dem Triplettssystem (intersystem crossing, ISC) wird bei der Anregung mit Licht im Allgemeinen dennoch nicht beobachtet, da die notwendige Spinänderung gemäß der nichtrelativistischen Quantentheorie verboten ist. ISC findet nur statt, wenn die relativistische Kopplung zwischen Spin- und Bahndrehimpuls einzelner Elektronen ($j_i = l_i + s_i$) die Kopplung der Gesamtimpulse ($J = L + S$) dominiert.[64] Im formalen nichtrelativistischen Verbot des ISC liegt die Ursache für die lange Lebensdauer des T_1 , die mehrere Millisekunden betragen kann.

Spontan geht der T_1 strahlungslos durch erneutes ISC oder unter Abgabe eines Photons in den S_0 über. Der strahlende Zerfall heißt Phosphoreszenz. Der aus Triplettensembles erzeugte Photonenstrom des Phosphoreszenz ist aufgrund seiner langen Lebensdauer um Größenordnungen schwächer als der Photostrom der Fluoreszenz. Wegen der geringen Leuchtkraft und vor allem der Unterdrückung von Fluoreszenz durch die Besetzung des T_1 ist dieser ein sogenannter Dunkelzustand.

Durch vermehrte Triplettbesetzung wird also die Emission eines Fluoreszenzfarbstoffs begrenzt. Typischerweise nimmt dadurch auch die Volatilität gegenüber lichtinduziertem Photobleichen zu.[65, 66] Es ist daher wünschenswert, die Triplettbesetzung niedrig zu halten. Abb. 2.4 zeigt zwei dafür genutzte Wege: Der Farbstoff kann über ein weiteres Molekül nichtstrahlend in den Grundzustand quenched werden. Zum Beispiel bildet Sauerstoff in seinem Triplettgrundzustand mit dem Farbstoffmolekül einen Stoßkomplex, der dann über verschiedene Wege weiterreagiert.[67, 68] Abhängig von Fluorophor kann dies tatsächlich erst zu Photobleichen führen, indem die Farbstoffe durch den anwesenden Sauer-

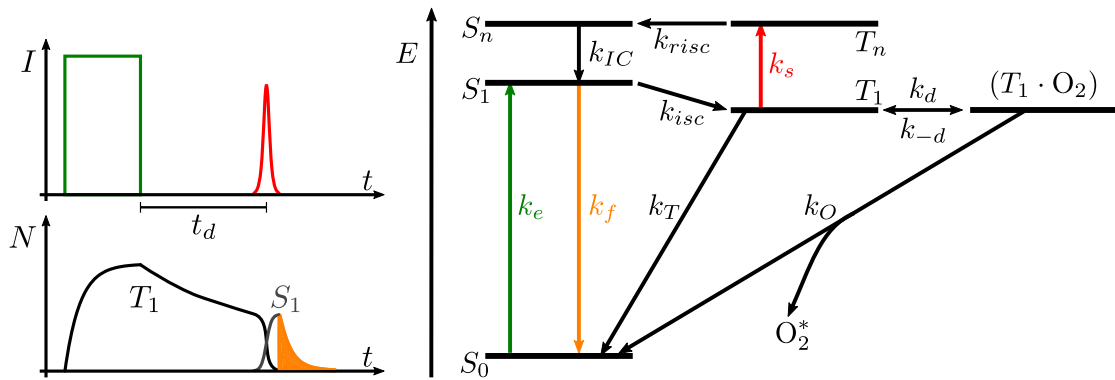
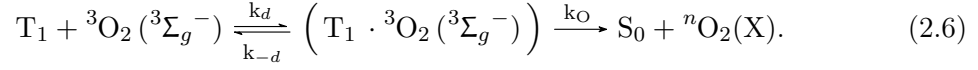


Abbildung 2.4.: Reverse intersystem crossing und Sauerstoffquenching eines Triplettensensibilisators. Die Pulsfolge der Pump-Probe-Spektroskopie muss zur Sättigung des Triplettzustands T_1 ein (quasi)-cw Pumpfenster beinhalten.

stoff oxidiert werden.[69] Geschieht dies nicht, kehrt der Fluorophor gemäß der folgenden Reaktionsgleichung in seinen Singulettgrundzustand zurück:



In (2.6) bezeichnet $n \in \{1, 3\}$ den Singulett- bzw. Triplettzustand von Sauerstoff und X dessen Elektronenkonfiguration und k_O fasst mehrere Zerfallswege zusammen. Üblicherweise befindet sich der Fluorophor im Gleichgewicht mit seinem Stoßkomplex und die resultierende Reaktionsgleichung für das Sauerstoffquenching lautet[14]



Da es nicht immer problemlos möglich ist, einen Quencher in das Reaktionsmedium einzubringen, hat sich als weitere Methode die Desaktivierung mit Hilfe einer zusätzlichen Anregungswellenlänge λ_s etabliert.[70] Sie ist mit der Ratenkonstante k_s resonant zu Übergängen vom T_1 in höher angeregte Triplettzustände T_n , aus den der Farbstoff durch ISC in den Singulettzweig zurückkehren kann. Da die Moleküle bei dieser Art der Triplettedesaktivierung durch Fluoreszenz in den Grundzustand übergehen – das ISC also effektiv umkehrt wird – heißt sie reversed intersystem crossing (RISC). Der Weg von T_1 nach S_1 ist nicht immer eindeutig, somit lautet, mit dem effektiven Wirkungsquerschnitt $\sigma_{risc}(\lambda_s)$ und der Anregungsintensität I_s , die effektive Ratenkonstante für das RISC

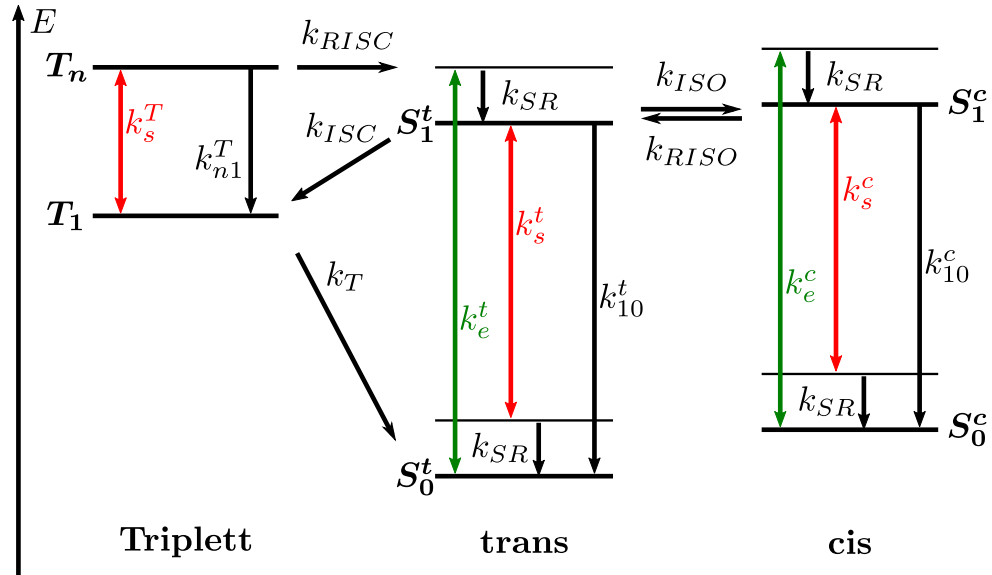


Abbildung 2.5.: MC540 kann nach Anregung in das cis-Isomer übergehen oder in den Triplettzustand.

$$k_{risc}^{eff} = \sigma_{risc}(\lambda_s) I_s. \quad (2.8)$$

RISC beruht auf dem Prinzip der Doppelresonanz und lässt sich durch Verwendung gepulster Anregung zeitaufgelöst betreiben. Abb. 2.4 weist für die Pulsfolge einen wichtigen Unterschied zu anderen Pump-Probe-Methoden auf: Die Pumpe ist kein einzelner Puls, sondern ein für mehrere Pulse oder einen cw-Laser offenes Fenster. Dadurch wird die Besetzung des Triplettzustands maximiert, um möglichst viel Fluoreszenz nach erfolgreichen RISC beobachten zu können.

Pump-Probe-RISC ermöglicht die Untersuchung der Dynamik des Triplettzustands. Sie erlangt zunehmend an Bedeutung, denn der Dunkelzustand wird in Verfahren der auflösungsgrenzendurchbrechenden Mikroskopie eingesetzt. In der GSD-Mikroskopie (ground state depletion, Grundzustandslöschung) kann die Grundzustandsbesetzung in der Triplettzustand transferiert werden; [71, 72] den Methoden mit statistischer Fluoreszenzrekonstruktion [2, 3] steht eine alternative zu photoaktivierten Farbstoffen zur Verfügung. [73, 74] Methoden zur Aufklärung der Dynamik des Triplettzustands sind auch von medizinischem Interesse. Denn schon seit einiger Zeit werden Triplettphänomene medizinische Genutzt, wie beispielsweise das oben erwähnte Sauerstoffquenching [75]: Stoßkomplexe aus (2.6) gehen in reaktive Sauerstoffspezies über, die zelltoxisch wirken und zur Krebstherapie geeignet sind. [76]

Zu den gut untersuchten Photosensibilatoren mit nachgewiesenem RISC gehört Mero-cyanin 540. [77] Es besitzt eine komplexe Zustandsdynamik, da es sowohl signifikant in den Triplettzustand übergehen kann, als auch cis-trans-Isomerie zeigt. Abb. 2.5 umfasst alle bedeutenden Zustände, die MC540 nach der ersten Anregung mit λ_e einnimmt. Der cis-Triplett kann vernachlässigt werden, da gemeinsames Auftreten von ISC und Isomerisierung unwahrscheinlich ist. [47] Das aus Abb. 2.5 folgende Differentialgleichungssystem ist umfangreich. Zur Interpretation zeitaufgelöster Messungen muss dieses System auf ein handhabbares reduziert werden. Die Schwierigkeit liegt darin, dennoch alle beteiligten Übergänge zu erfassen. In Abschnitt 4.2 wird unter Vernachlässigung des cis-Isomers ein Differentialgleichungssystem hergeleitet, dass die experimentellen Resultate erklären kann.

2.2. Zeitaufgelöste 2PE-Fluoreszenzanisotropie

2.2.1. Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie

Die Wechselwirkung von Photonen mit Molekülen hat immer tensoriellen Charakter. Übergänge, an denen lediglich ein Photon beteiligt ist, werden durch Tensoren erster Stufe – Vektoren – beschrieben, dem Übergangsdipolmoment

$$\boldsymbol{\mu}_{DP} = e \langle f | \mathbf{r} | g \rangle = e \int dV \varphi_f^*(\mathbf{r}) \mathbf{r} \varphi_g(\mathbf{r}). \quad (2.9)$$

Dabei indiziert g den Ausgangs- und f den Endzustand; e ist die Elementarladung. Einzelne fluoreszierende Moleküle emittieren daher linear polarisiert.

Nicht rotierende Moleküle absorbieren nun linear polarisiertes Licht mit elektrischem Feld in Richtung \mathbf{e}_{ex} . Aufgrund der selektiven Anregung proportional zu $\mathbf{e}_{ex} \boldsymbol{\mu}_{DP}$ ergibt sich eine Vorzugsrichtung auch bei der Emission, die in der Regel parallel zur Absorption erfolgt. Die Detektion erfolgt, wie in Abb. 2.6 dargestellt, in zwei orthogonalen Polarisationsrichtungen, \mathbf{p}_{vv} und \mathbf{p}_{vh} . v und h bezieht sich dabei auf die Polarisation vertikal bzw. horizontal zur von Lichtquelle (Q), Probe (S) und Detektor (D) festgelegten Ebene. Die Intensität bei Beobachtung der Emission parallel (I_{vv}) bzw. senkrecht (I_{vh}) zu \mathbf{e}_{ex} definiert die stationäre Anisotropie

$$r = \frac{I_{vv} - GI_{vh}}{I_{vv} + 2GI_{vh}} := \frac{D}{S}. \quad (2.10)$$

Der Faktor 2 ist notwendig, da zwei linear unabhängige Raumdimensionen senkrecht zur Anregungspolarisation stehen. G korrigiert Unterschiede der Detektionseffizienz zwischen paralleler und senkrechter Emission. Werden zufällig orientierte Moleküle betrachtet, muss über alle Orientierungen gemittelt werden und es ergibt sich[14]

$$r = \frac{3 \langle \cos^2 \Theta \rangle - 1}{2}, \quad (2.11)$$

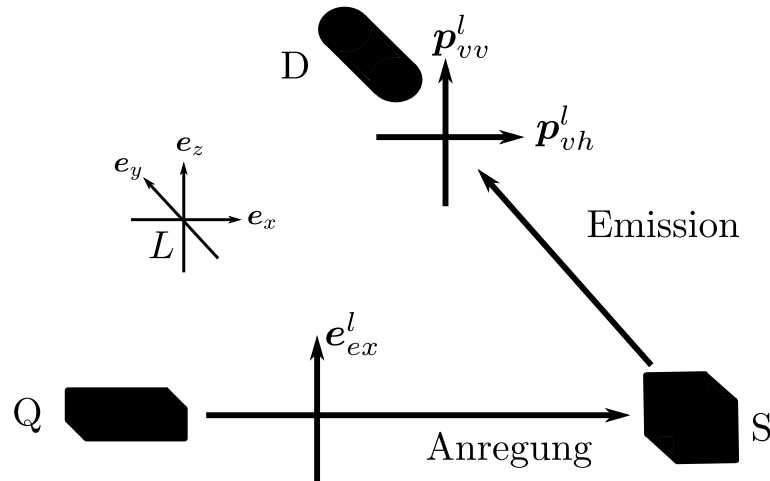


Abbildung 2.6.: Schematische Darstellung der relevanten Polarisationsrichtungen im Laborkoordinatensystem L bei linear polarisiert angeregter Anisotropie.

wobei Θ den Winkel zwischen emittierendem Dipol und \mathbf{e}_{ex} beschreibt. Ist der mittlere Winkel $\Theta_M = 54,7^\circ$, verschwindet die Anisotropie. Θ_M wird „Magic Angle“ genannt. Durch die PhotoSelektion bei der Einphotonenanregung (1PE) ist

$$\langle \cos^2 \Theta \rangle = \frac{\int_0^{\pi/2} d\Theta f_1 \cos^2 \Theta}{\int_0^{\pi/2} d\Theta f_1}, \quad (2.12)$$

mit $f_1 = \cos^2 \Theta \sin \Theta$. Aus (2.11) und (2.12) ergibt sich für die 1PE eine maximale Anisotropie von $r_{max} = 0,4$.

Liegen Absorptions- und Emissionsdipolmoment nicht parallel, sondern in einem Winkel β zueinander, ist die maximal mögliche Anisotropie die fundamentale Anisotropie

$$r_f = 0,4 \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \leq 0,4. \quad (2.13)$$

Messen lässt sich r_f vorzugsweise durch das Einfrieren der Farbstoffmoleküle im Lösemittelkäf bei niedrigen Temperaturen. So können verschiedene Lösemittel verglichen werden. In [78] wurde für Perylen und verschiedene davon abgeleitete Moleküle gezeigt, dass r_f unabhängig vom Lösemittel ist. Librationen als Ursache der Abweichung[79] kommen nicht mehr in Frage, da diesen eine Wechselwirkung mit dem Lösemittel zu Grunde liegt. Der aktuelle Erklärungsversuch ist eine Kopplung der Übergangsdipole an Vibrationsmoden.

Freie Moleküle in Lösung unterliegen im Gegensatz zur bisherigen Diskussion der Rotationsdiffusion. Mit zeitaufgelösten Fluoreszenzmethoden wie zeitkorreliertem Einzelphotonenzählen (TCSPC, Time correlated Single Photon Counting) (vgl. Abschnitt 3.4.2) lässt sich ein multiexponentieller Anisotropiezerfall beobachten:

$$r(t) = \sum_i r_i(0) \exp(-t/\phi_i). \quad (2.14)$$

$r_i(0)$ und ϕ_i sind die initiale Anisotropie bzw. die Lebensdauer der jeweiligen Anisotropiekomponente. Ist $\sum_i r_i(0) := r(0) < r_f$, so liegen schnelle Anisotropiezerfälle vor, die mit dem zur Verfügung stehenden experimentellen Aufbau nicht aufgelöst werden können.

Um zeitaufgelöste Fluoreszenz rotationsdiffusionsfrei zu messen, kann die Emission unter dem Magic Angle beobachtet werden.

Die Eigenschaften von (2.14) ergeben sich aus der im Allgemeinen umfangreichen und komplizierten Behandlung Rotationsdiffusion anisotroper Moleküle.[80] Der für diese Arbeit relevante Fall für den 2PE-Anisotropiezerfall oblater Moleküle wird in Abschnitt 2.2.3 diskutiert.

2.2.2. Simultane Absorption zweier Photonen

Bei Intensitäten jenseits von 10^{10} W/m^2 können viele Moleküle durch die gleichzeitige Absorption zweier Photonen angeregt werden. Eine kurze Darstellung der physikalischen Zusammenhänge findet sich in [44]. Übergänge der 2PE werden im Gegensatz zu (2.9) mit einem Tensor zweiter Stufe, dem Übergangstensor, mit den Elementen

$$S_{\alpha\beta} = \sum_k \frac{\langle f|r_\alpha|k\rangle \langle k|r_\beta|g\rangle}{\omega_{kg} - \omega_1} + \frac{\langle f|r_\beta|k\rangle \langle k|r_\alpha|g\rangle}{\omega_{kg} - \omega_2} \quad (2.15)$$

beschrieben. Es werden zwei im Allgemeinen unterschiedliche Photonen $\hbar\omega_1$ und $\hbar\omega_2$ absorbiert. g , f und k indizieren jeweils den Grundzustand, den Endzustand und alle (virtuellen) Zustände im Molekül, die zum Übergang beitragen. Es gilt $\omega_{kg} = \frac{\Delta E_{kg}}{\hbar}$. Der selektiven Anregung $\mathbf{e}_{ex}\boldsymbol{\mu}_{DP}$ der 1PE entspricht in der 2PE die Größe

$$S_{fg} = \sum_k \frac{\mathbf{e}_2 \langle f|\mathbf{r}|k\rangle \langle k|\mathbf{r}|g\rangle \mathbf{e}_1}{\omega_{kg} - \omega_1} + \frac{\mathbf{e}_1 \langle f|\mathbf{r}|k\rangle \langle k|\mathbf{r}|g\rangle \mathbf{e}_2}{\omega_{kg} - \omega_2}, \quad (2.16)$$

wobei \mathbf{e}_i die Polarisationen der Photonen sind. Dabei ist zu beachten, dass die \mathbf{e}_i raumfest sind, \mathbf{r} aber im Molekülkoordinatensystem definiert ist. Für Küvettenexperimente ist daher eine umfangreiche Orientierungsmittelung notwendig.[81] Aufgrund der Integrale $\langle f|\mathbf{r}|k\rangle \langle k|\mathbf{r}|g\rangle$ erreicht die 2PE Zustände $|f\rangle$ mit derselben Parität wie $|g\rangle$, bei 1PE muss die Parität verschieden sein. Aus (2.16) kann gefolgert werden, dass die Art des beobachteten Übergangs empirisch bestimmbar ist.[82] Dazu müssen zwei unterschiedlich polarisierte Laserstrahlen mit sub-*ps*-Pulsen raum- und vor allem zeitrichtig überlagert werden.[83] Im folgenden Abschnitt wird eine Methode vorgestellt, die mit gleichen Photonen auskommt.

2.2.3. Bestimmung des Übergangstensors mit zeitaufgelöster Anisotropie

2.2.3.1. 2PE-Anisotropie in Abhängigkeit molekularer Parameter

Die maximale Anisotropie bei der 2PE beträgt immer $r(0) = 0,57$. Wegen der Proportionalität zu $\cos^2 \Theta$ für beide Photonen ist die simultane Wechselwirkung proportional zu $\cos^4 \Theta$ und in (2.12) wird f_1 ersetzt durch $f_2 = \cos^4 \Theta \sin \Theta$. [14, Kap. 18]

Die Emission werde entlang \mathbf{e}_{em} mit einem Polarisator beobachtet. Die Wahrscheinlichkeit w_{em} , ein von einem Farbstoffmolekül mit dem Übergangsdipolmoment $\boldsymbol{\mu}_{DP,em}$ emittiertes Photon zu beobachten, ist proportional zu

$$w_{em} \propto |\mathbf{e}_{em}\boldsymbol{\mu}_{DP,em}|^2. \quad (2.17)$$

Ebenso ist die Absorptionswahrscheinlichkeit proportional zu $|S_{fg}|^2$. Bei Beschränkung auf gleiche Photonen und mit der Repräsentation des Übergangstensors als kartesische 3×3 -Matrix \mathcal{T} gilt:

$$w_{ex} \propto |\mathbf{e}_{ex} \mathcal{T} \mathbf{e}_{ex}|^2. \quad (2.18)$$

Um diese Wahrscheinlichkeiten mit der zeitabhängigen Anisotropie $r(t)$ in Verbindung zu bringen, müssen zunächst relevante Koordinatensysteme (KOS) definiert werden. In Abb. 2.6 ist das Laborkoordinatensystem L festgelegt, in dem die Photonenpolarisationen definiert sind. Das molekülfeste Koordinatensystem M ist so festgelegt, dass $\mathbf{e}_x(M) \parallel \boldsymbol{\mu}_{DP}$. Die Beziehung zwischen den beiden kartesischen KOS ist in Abb. 2.7 dargestellt. Sie werden mit einer zeitabhängigen Koordinatentransformation ($\Omega_{ML}(t)$) mittels Eulerwinkel miteinander verbunden. Die detektierte Intensität nach 2PE ist demnach proportional zu

$$I(t) \propto \langle w_{ex}(\Omega_{ML}(0)) w_{em}(\Omega_{ML}(t)) \rangle f(t), \quad (2.19)$$

wobei $f(t)$ der Zerfall der Fluoreszenz ist. Durch das Betragsquadrat enthält w_{em} das direkte Produkt des Übergangsdipolmoments mit sich selbst, den Emissionstensor zweiter Stufe:

$$\mathcal{M} = \boldsymbol{\mu}_{DP,em} \otimes \boldsymbol{\mu}_{DP,em}. \quad (2.20)$$

I_{vv} ($\mathbf{e}_{em} = {}^T(0, 0, 1)$) und I_{vh} ($\mathbf{e}_{em} = {}^T(1, 0, 0)$) aus (2.10) schreiben sich für noch beliebige Anregung

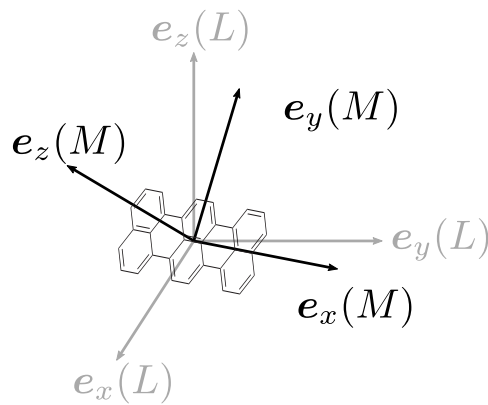


Abbildung 2.7.: Terrylen mit molekülfestem Koordinatensystem $\mathbf{e}_i(M)$ kann sich frei gegen das Laborkoordinatensystem $\mathbf{e}_i(L)$ drehen.

$$\begin{aligned} I_{vv} &= \left\langle |e_{ex} \mathcal{T}(0) e_{ex}|^2 \mathcal{M}_{zz}(t) \right\rangle f(t) \\ I_{vh} &= \left\langle |e_{ex} \mathcal{T}(0) e_{ex}|^2 \mathcal{M}_{xx}(t) \right\rangle f(t) = \left\langle |e_{ex} \mathcal{T}(0) e_{ex}|^2 \mathcal{M}_{yy}(t) \right\rangle f(t). \end{aligned} \quad (2.21)$$

Aufgrund der kompakteren Darstellung ist die Transformation der Tensoren ins Laborkoordinatensystem, $\Omega_{ML}(t)$, durch die Zeitabhängigkeit angezeigt. Die x - und y -Koordinatenachsen sind hier bezüglich der Rotationsdiffusion für die Emission äquivalent. Damit wird (2.10) für linear polarisierte Anregung ($e_{ex} = {}^T(0, 0, 1)$) zu

$$r^l(t) = \frac{\langle T_{zz}(0)^2 (M_{zz}(t) - M_{xx}(t)) \rangle}{\langle T_{zz}(0)^2 \text{spur } \mathcal{M}(t) \rangle} \quad (2.22)$$

und für zirkulare Polarisation ($e_{ex} = {}^T(\frac{1}{\sqrt{2}}, i\frac{1}{\sqrt{2}}, 0)$) zu

$$r^c(t) = \frac{\langle |T_{xx}(0) - T_{yy}(0) + i(T_{xy}(0) + T_{yx}(0))|^2 (M_{zz}(t) - M_{xx}(t)) \rangle}{\langle |T_{xx}(0) - T_{yy}(0) + i(T_{xy}(0) + T_{yx}(0))|^2 \text{spur } \mathcal{M}(t) \rangle}. \quad (2.23)$$

Das heißt, dass die zirkular polarisierte Anregung senkrecht zur linear polarisierten erfolgen muss, damit (2.10) gültig bleibt. Parallele (I_{vv}) und senkrechte (I_{vh}) Detektion beziehen sich nun auf die Ausbreitungsrichtung des Lichtes. Aus Abb. 2.8 wird ersichtlich, dass die Anregung durch eine $\pi/2$ -Rotation um die y -Achse auch in e_x -Richtung erfolgen kann, wobei sich die Zuordnungen der Emissionspolarisatoren vertauschen.

Für den Fall der nicht-resonanten 2PE mit identischen Photonen ist \mathcal{T} ein symmetrischer und reeller kartesischer Tensor.[82] Weil Orientierungsmittelungen in kartesischen Koordinaten

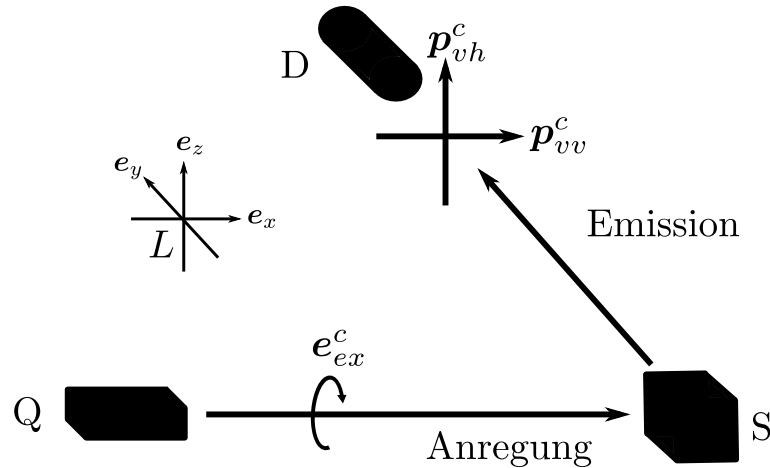


Abbildung 2.8.: Schematische Darstellung der relevanten Polarisationsrichtungen im Laborkoordinatensystem L bei zirkular polarisiert angeregter Anisotropie.

mathematisch schwer zu handhaben sind,[21] wird zur Berechnung von (2.22) und (2.23) die irreduzible Darstellung verwendet. Die relevanten irreduziblen Komponenten für Tensoren zweiter Stufe lauten[84]

$$T_0 = \frac{1}{\sqrt{6}}(3T_{zz} - \text{spur } \mathcal{T}) \quad \text{und} \quad T_{\pm 2} = \frac{1}{2}(T_{xx} - T_{yy} \pm i2T_{xy}). \quad (2.24)$$

Damit lassen sich (2.22) und (2.23) in folgender Form schreiben:

$$\begin{aligned} r^l(t) &= \frac{6 \text{ spur } \mathcal{T} \langle T_0(0) M_0(t) \rangle + 3\sqrt{6} \langle T_0(0)^2 M_0(t) \rangle}{(\text{spur } \mathcal{T})^2 + 6 \langle T_0(0)^2 \rangle \text{ spur } \mathcal{M}} \\ r^c(t) &= \sqrt{\frac{3}{2}} \frac{\langle T_2(0) T_{-2}(0) M_0(t) \rangle}{\langle T_2(0) T_{-2}(0) \rangle \text{ spur } \mathcal{M}(t)}. \end{aligned} \quad (2.25)$$

Die folgende Orientierungsmittelung und die Rückberechnung in anschauliche kartesische Koordinaten ist in [21] ausgeführt. $r^l(t)$ und $r^c(t)$ für die Rotationen beliebiger Moleküle anzugeben ist jedoch mit unhandlichen Termen verbunden. Mit Wissen über die Eigenschaften der Rotation und von \mathcal{T} lassen sich diese weitgehend reduzieren.

2.2.3.2. Rotationsverhalten von Perylen und Terrylen

Aufgrund dreier verschiedener Ausdehnungen $d_x \neq d_y \neq d_z$ (vgl. Abb. 2.9) besitzen Perylen und Terrylen unterschiedliche Rotationsdiffusionskoeffizienten $D_x \neq D_y \neq D_z$ und damit drei Rotationskorrelationszeiten. Einfachere Rotationsellipsoide ergeben sich beispielsweise für oblate ($d_z < d_x = d_y$) oder prolate ($d_x > d_y = d_z$) Moleküle.[14, Kap. 12.3]

Die Bindungslängen von Naphthalen[85] ($l_x = 142$ pm, $l_y = 137$ pm) und die zwischen den Naphthaleneinheiten von Rylenen[86] ($l_i = 150$ pm) sind bekannt. Somit ist Perylen $l_{Pe} \approx 625$ pm und Terrylen $l_{Te} \approx 1012$ pm lang. Beide sind $b \approx 475$ pm breit. Damit ist $\frac{l_{Pe}}{b} \approx 1,3$ womit Perylen als oblates Molekül einzustufen ist. Terrylen liegt mit $\frac{l_{Te}}{b} \approx 2,1$ deutlich darüber, aber unterhalb von eindeutig prolatischen Molekülen wie Diphenylhexatrien mit $\frac{l_{DPH}}{b_{DPH}} \approx 5$. Die in Abschnitt 4.3 nachgewiesenen zwei Rotationsdiffusionzerfälle zeigen,

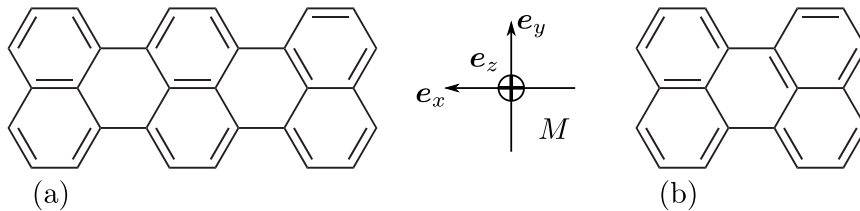


Abbildung 2.9.: Aufsicht auf (a) Terrylen und (b) Perylen und Festlegung des Molekülkoordinatensystems M .

dass Terrylen sich wie ein oblates Molekül verhält.

Wie bereits erwähnt soll in $M \mu_{DP} || e_x(M)$ gelten. Explizit ist das molekülfeste KOS für Perylen und Terrylen in Abb. 2.9 festgelegt. Mit den Diffusionskonstanten⁵ $D_z > D_x = D_y$ ergeben sich die zwei Rotationskorrelationszeiten[87]

$$\phi_0 = \frac{1}{6D_x} \quad \text{und} \quad \phi_2 = \frac{1}{4D_z + 2D_x}. \quad (2.26)$$

Die zugehörigen Anisotropiezerfälle lauten

$$\begin{aligned} r^l(t) &= r_0^l \exp(t/\phi_0) + r_2^l \exp(t/\phi_2) \\ r^c(t) &= r_0^c \exp(t/\phi_0) + r_2^c \exp(t/\phi_2). \end{aligned} \quad (2.27)$$

Mit den Indizes werden die Zerfälle den irreduziblen Komponenten aus (2.24) zugeordnet. Die Diffusionskonstanten in (2.26) lassen sich mit einem angepassten Debye-Stokes-Einstein-Gesetz beschreiben:[23]

$$D_i \propto \frac{k_B T}{\eta V_i}, \quad (2.28)$$

mit der Boltzmannkonstanten k_B , der absoluten Temperatur T , der Lösemittelviskosität η und dem hydrodynamischen Volumen des Rotationskörpers V_i . Das Verhältnis $R_\phi = \frac{\phi_0}{\phi_2}$ der Korrelationszeiten liefert dann

$$\frac{V_x}{V_z} = \frac{3}{2} \left(R_\phi - \frac{1}{3} \right), \quad (2.29)$$

das Verhältnis der Volumina bei Rotation um die entsprechende Achse. Es ist zu beachten, dass (2.28) einen Diffusionstensor[88] darstellt, und die Proportionalitätskonstanten richtungsabhängig sein können. In (2.29) ersetzt dann eine Proportionalität die Gleichheit. Für ϕ_0 zweier unterschiedlicher Systeme gilt

$$R_0(a, b) = \frac{\phi_0(a)}{\phi_0(b)} = \frac{\eta(a) V_x(a)}{\eta(b) V_x(b)}, \quad (2.30)$$

wobei sich die Viskositäten auf die Lösemittel und die Volumina auf die Moleküle beziehen.

2.2.3.3. Der Übergangstensor von Perylen und Terrylen

Beide Moleküle sind in z -Richtung quasi nicht ausgedehnt, womit die Beiträge zu \mathcal{T} mit z -Komponente verschwinden. Der reduzierte Übergangstensor lautet

⁵Aufgrund geringerer Lösemittelwechselwirkungen rotieren die planen Moleküle schneller in ihrer Molekülebene als senkrecht dazu.

$$\mathcal{T}_R = \begin{pmatrix} T_{xx} & T_{xy} \\ T_{xy} & T_{yy} \end{pmatrix}. \quad (2.31)$$

Im Folgenden sind die Tensorelemente gemäß $\sum_{i,j} T_{ij}^2 \equiv 1$ normiert. Weiterhin gehören Perylen und Terrylen zur Punktgruppe D_{2h} , womit genau zwei mögliche Varianten für durch \mathcal{T} vermittelte Übergänge verbleiben:[81]

$$\mathcal{T}_{A_g} = \begin{pmatrix} T_{xx} & 0 \\ 0 & T_{yy} \end{pmatrix} \quad \text{und} \quad \mathcal{T}_{B_{1g}} = \begin{pmatrix} 0 & T_{xy} \\ T_{xy} & 0 \end{pmatrix}. \quad (2.32)$$

Beide können einen Beitrag zu $r(t)$ liefern, wenn ein entsprechender Übergang an der Anregung beteiligt ist. Da sich die Anisotropie additiv verhält,[21] lassen sich die Anisotropien wie folgt schreiben:

$$\begin{aligned} r^l(t) &= (1 - f^l) r_{\mathcal{T}_{A_g}}^l(t) + f^l r_{\mathcal{T}_{B_{1g}}}^l(t) \\ r^c(t) &= (1 - f^c) r_{\mathcal{T}_{A_g}}^c(t) + f^c r_{\mathcal{T}_{B_{1g}}}^c(t), \end{aligned} \quad (2.33)$$

wobei f^i der jeweilige Beitrag der durch $\mathcal{T}_{B_{1g}}$ hervorgerufenen Anregung zu r^i ist. Durch Einsetzen von (2.27) in (2.33) werden die Anisotropien zu

$$\begin{aligned} r^l(t) &= \left((1 - f^l) r_2^l(\mathcal{T}_{A_g}) + f^l r_2^l(\mathcal{T}_{B_{1g}}) \right) \exp(-t/\phi_2) \\ &\quad + \left((1 - f^l) r_0^l(\mathcal{T}_{A_g}) + f^l r_0^l(\mathcal{T}_{B_{1g}}) \right) \exp(-t/\phi_0) \\ r^c(t) &= \left((1 - f^c) r_2^c(\mathcal{T}_{A_g}) + f^c r_2^c(\mathcal{T}_{B_{1g}}) \right) \exp(-t/\phi_2) \\ &\quad + \left((1 - f^c) r_0^c(\mathcal{T}_{A_g}) + f^c r_0^c(\mathcal{T}_{B_{1g}}) \right) \exp(-t/\phi_0). \end{aligned} \quad (2.34)$$

Nun können die Vorfaktoren aus den Orientierungsmittelungen angegeben werden. Gemäß [21] sind sie für den linear polarisierten Fall

$$\begin{aligned} r_2^l(\mathcal{T}_{A_g}) &= \frac{3}{7} \frac{3T_{xx}^2 + 3T_{yy}^2}{3T_{xx}^2 + 3T_{yy}^2 + 2T_{xy}^2} & r_0^l(\mathcal{T}_{A_g}) &= \frac{1}{7} \\ r_2^l(\mathcal{T}_{B_{1g}}) &= 0 & r_0^l(\mathcal{T}_{B_{1g}}) &= \frac{1}{7} \end{aligned} \quad (2.35)$$

und für den zirkular polarisierten

$$\begin{aligned} r_2^c(\mathcal{T}_{A_g}) &= -\frac{3}{14} \frac{T_{xx}^2 - T_{yy}^2}{T_{xx}^2 + T_{yy}^2 - T_{xx}T_{yy}} & r_0^c(\mathcal{T}_{A_g}) &= -\frac{1}{14} \frac{T_{xx}^2 + T_{yy}^2 - 4T_{xx}T_{yy}}{T_{xx}^2 + T_{yy}^2 - T_{xx}T_{yy}} \\ r_2^c(\mathcal{T}_{B_{1g}}) &= 0 & r_0^c(\mathcal{T}_{B_{1g}}) &= -\frac{1}{7}. \end{aligned} \quad (2.36)$$

Demnach ist r_0^l aus (2.27) konstant und es bleiben die drei Bestimmungsgleichungen

$$\begin{aligned} r_2^l &= (1 - f^l) \frac{3}{7} \frac{3T_{xx}^2 + 3T_{yy}^2}{3T_{xx}^2 + 3T_{yy}^2 + 2T_{xy}^2} \\ r_0^c &= -(1 - f^c) \frac{1}{14} \frac{T_{xx}^2 + T_{yy}^2 - 4T_{xx}T_{yy}}{T_{xx}^2 + T_{yy}^2 - T_{xx}T_{yy}} - f^c \frac{1}{7} \\ r_2^c &= -(1 - f^c) \frac{3}{14} \frac{T_{xx}^2 - T_{yy}^2}{T_{xx}^2 + T_{yy}^2 - T_{xx}T_{yy}}, \end{aligned} \quad (2.37)$$

aber die vier⁶ unabhängigen Variablen f^l , f^c , T_{xx} und T_{xy} . Für eindeutige Lösungen ist eine weitere Bestimmungsgleichung notwendig. Das Intensitätsverhältnis zwischen zirkularer und linearer Polarisation, Ω_{TP} , bietet sich an. Es gilt:

$$\Omega_{TP} = \frac{S^c(t)}{S^l(t)} = \frac{S_{\mathcal{T}_{Ag}}^c(t) + S_{\mathcal{T}_{B1g}}^c(t)}{S_{\mathcal{T}_{Ag}}^l(t) + S_{\mathcal{T}_{B1g}}^l(t)} = \frac{2T_{xx}^2 + 2T_{yy}^2 - 2T_{xx}T_{yy} + 6T_{xy}^2}{3T_{xx}^2 + 3T_{yy}^2 + 2T_{xx}T_{yy} + 4T_{xy}^2}. \quad (2.38)$$

Ω_{TP} kann auch aus Messungen unter Magic Angle Bedingungen gewonnen werden.

2.2.3.4. Einfluss schneller Depolarisationen

Die nicht messbaren, anisotropiemindernden Effekte wirken sich auf die schnellen Komponenten r_2^l und r_2^c aus. Um nun Messwerte auf molekulare Parameter umzurechnen ist ein Korrekturfaktor nötig. Dieser ergibt sich durch den Vergleich von Tieftemperaturmessungen zur Bestimmung der fundamentalen Anisotropie[78] mit der maximalen Anisotropie $r^1(0)$ aus zeitaufgelöster 1PE-Anisotropie. Der Polarisationsverlust wird einer initialen Rotation um $\mathbf{e}_z(M)$ zugeschrieben. Damit ist mit dem empirisch gefundenen maximalen Drehwinkel α_z dieser Rotation der Korrekturfaktor

$$r_2^i = \left| \frac{2\alpha_z}{\sin(2\alpha_z)} \right|^2 r_2^i(exp). \quad (2.39)$$

Mit (2.40) steht nun ein Gleichungssystem zur Verfügung, mit dem der vollständige Übergangstensor eines oblat rotierenden Moleküls mit Hilfe einer überschaubaren Anzahl von Messungen bestimmt werden kann. Mit stationärer Tieftemperaturanisotropie wird zunächst α_z bestimmt. Zwei TSCPC-Spuren unter magic angle Bedingungen liefern Ω_{TP} . Die r_i^j werden mittels zeitaufgelöster 2PE-Fluoreszenzanisotropie – zirkular bzw. linear polarisiert angeregt – bestimmt. Zur Festlegung der Rotationskorrelationszeiten der Anisotropiemessungen werden zusätzlich einphotonenangeregte Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Somit können die vier unabhängigen Variablen f^l , f^c , T_{xx} und T_{xy} bestimmt werden.

⁶Ein Tensorelement (hier: T_{yy}) ist über die Normierungsbedingung $\sum_{i,j} T_{ij}^2 \equiv 1$ festgelegt.

Die finale Form des zu lösenden Gleichungssystems – auf den Zusatz (*exp*) wird wieder verzichtet – lautet:

$$\begin{aligned}
 r_2^l &= \left| \frac{\sin(2\alpha_z)}{2\alpha_z} \right|^2 (1 - f^l) \frac{3}{7} \frac{3T_{xx}^2 + 3T_{yy}^2}{3T_{xx}^2 + 3T_{yy}^2 + 2T_{xy}^2} \\
 r_0^c &= -(1 - f^c) \frac{1}{14} \frac{T_{xx}^2 + T_{yy}^2 - 4T_{xx}T_{yy}}{T_{xx}^2 + T_{yy}^2 - T_{xx}T_{yy}} - f^c \frac{1}{7} \\
 r_2^c &= - \left| \frac{\sin(2\alpha_z)}{2\alpha_z} \right|^2 (1 - f^c) \frac{3}{14} \frac{T_{xx}^2 - T_{yy}^2}{T_{xx}^2 + T_{yy}^2 - T_{xx}T_{yy}} \\
 \Omega_{TP} &= \frac{2T_{xx}^2 + 2T_{yy}^2 - 2T_{xx}T_{yy} + 6T_{xy}^2}{3T_{xx}^2 + 3T_{yy}^2 + 2T_{xx}T_{yy} + 4T_{xy}^2}.
 \end{aligned} \tag{2.40}$$

3. Experimenteller Teil

3.1. Probenpräparation

3.1.1. Herstellen der Farbstofflösungen

Eine genaue Auflistung der verwendeten Farbstoffe und Lösungsmittel findet sich in Tab. A.2 im Anhang. Sofern nicht im Folgenden explizit angegeben, werden sie ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden folgende, 100 μ M Stammlösungen angesetzt: Merocyanin 540 (MC540) in Wasser und Ethanol, Perylen in 1,2-Propandiol (PDO), Rhodamin 6G (Rh6G) in Glycerin und Terrylen in Nonan, 1-Octanol, PDO und Squalen. Die Glycerinlösung wird im Ultraschallbad homogenisiert.

Zusätzlich wird eine von M. Teubner vorbereitete, 100 μ M Stammlösung von HPTA in Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Damit das hydrophile DMSO vor der Verwendung wasserfrei ist, muss es destilliert werden.[89] Mit Trifluoressigsäure (TFA) angesäuert liegt die Photosäure im Grundzustand vollständig protoniert vor.

3.1.2. Sauerstofffreie Proben

Messungen von Farbstofflösungen unter sauerstofffreier Atmosphäre sind mit konfokalen Aufbauten nicht ohne geeignete Probenkammer möglich. Diese müssen lösemittelbeständig sein, aber dennoch dünnwandig genug für den Arbeitsabstand des verwendeten Objektivs. Des Weiteren ist es durch die Art der Messungen – Photonen zählen, Korrelationsmessungen – notwendig, dass die Kammer über Stunden gegen das Eindringen von Sauerstoff dicht ist. Die gefundene Lösung ist ein Selbstbau.

Zunächst wird der Boden einiger 5 ml fassender *neoLab*-Schraubdeckelfläschchen vom Glasbläser der Universität entfernt. Die restlichen Arbeiten können selbst durchgeführt werden. Die oberen Hälften werden jeweils auf ein Deckglas (*Hecht Assistent 24x24x0,17(1)*) gesetzt. Von außen wird nun um die entstandene Kontaktfläche ein handelsüblicher Cyanacrylatkleber (*Pattex Sekundenkleber Glas*) aufgetragen. Durch die Mitte des Deckglases kann weiterhin problemlos gemessen werden (Abb. A.1.1(a)). Bevor der Kleber aushärtet, wird er mit einem Plastikspatel glattgezogen, um Luftbläschen in der Klebefläche zu vermeiden. Der Glas-Glas-Kontakt schließt somit luftdicht und bedingt chemikalienbeständig. Als Löse-

mittel geeignet sind etwa Wasser, Ethanol und Methyln-tetrahydrofuran (MTHF). Versuche mit DMSO, Toluol und Dichlormethan führten jedoch zu einer reversiblen Depolymerisation des Klebers.

Vor jeder Messung wird die Probenkammer mit der zu untersuchenden Lösung befüllt und mit einem Deckel verschlossen. Die Verschraubung alleine ist luftdurchlässig, weswegen sie zusätzlich mit einigen Lagen Parafilm abgedichtet wird, vgl. Abb. A.1.1(b). Der Deckel enthält eine Durchstichmembran, sodass mit Argon gespült werden kann (vgl. Abb. A.1.1(c)). Eine Injektionsnadel leitet Argon in die Lösung, über eine weitere entweicht überschüssiges Gas. Bei diesen Schritten ist Vorsicht geboten, da die Klebestelle mechanisch instabil ist. Das Deckglas kann abgedreht oder mit einer Nadel abgedrückt werden. Auch ein zu hoher Spüldruck oder das Entfernen der Überdrucknadel vor der Spülnadel führt zu einem Riss der Kammer.

Ein Spülvorgang dauert ca. 15 Minuten. Ist die Probe in Ethanol angesetzt, halbiert sich dabei das Lösemittelvolumen und die Farbstoffkonzentration erhöht sich entsprechend. Nach dem Spülen ist die Probe für mindestens 24 Stunden sauerstofffrei. Die Dichte wird mit Messungen der Fluoreszenzverstärkung von MC540 im Zweifarbexperiment nachgewiesen (vgl. Abb. 4.11), die sich nur in sauerstofffreier Atmosphäre zeigt.

Einmal geklebt sind die Probenkammern grundsätzlich wiederverwendbar. Wegen der geringen mechanischen Belastbarkeit hat sich jedoch das Ablösen und neu Kleben der Kammern gegenüber der Reinigung durchgesetzt. Die Deckgläser werden entsorgt.

3.2. UV-VIS- und Fluoreszenzspektroskopie

Zu Vermessung stationärer Absorptions-, Anregungs- und Emissionsspektren kommen das UV-VIS-Spektrometer *V-650* und das Fluoreszenzspektrometer *FP-6500* von *Jasco* zum Einsatz. Die Stammlösungen von MC540 und Rh6G werden zur Messung auf ein hundertstel der Ausgangskonzentration verdünnt. Perylen/PDO wird auf ein zwanzigstel und die Stammlösungen mit Terrylen gar nicht verdünnt. Zur Aufnahme der Spektren werden alle Maßlösungen in Küvetten aus optischem Spezialglas von *Hellma* mit 1 cm Pfadlänge gefüllt.

Tieftemperaturfluoreszenzspektren werden mit dem Kryostaten *Optistat DN* und der Temperaturkontrolleinheit *ITC503S* von *Oxford Instruments* durchgeführt. Ausreichende Isolation wird durch eine Evakuierung über Nacht gewährleistet, die alle 48 h bis 72 h stattfindet. Um eine Kondensation von Wasserdampf an den Messfenstern zu verhindern, muss die Probenkammer täglich 30 min evakuiert werden. Die Proben werden unter Stickstoffstrom eingesetzt. Das Abkühlen der Proben samt Kammer von Raumtemperatur auf 77 K erfolgt durch Zugabe von Flüssigstickstoff innerhalb von 30 min. Die notwendigen Vorbereitungen

übernahm M. Teubner.

Zur Vermessung werden Polystyrolküvetten mit 1 cm Pfadlänge von *Sarstedt* verwendet. Um die Anregung und Emission linear zu polarisieren werden zwei *FDP-203*-Polarisatoren von *Jasco* benutzt. Pro Temperatur werden acht Spektren – je 4 Polarisatorstellungen für Anregung und Emission – aufgenommen.

Alle Spektren werden mit *Origin 9.2G* von *OriginLab* aufgetragen. Für die Berechnung der Anisotropiespektren wurde ein Importskript erstellt.

3.3. Zeitaufgelöste Doppelresonanzspektroskopie

3.3.1. Kontrolle des Zeitabstands zweier Laser

Grundlage für zeitaufgelöste Messungen mittels DRS ist die Kontrolle des Zeitabstandes von Pump- und Abfragelaser. Grundsätzlich wird können Pulszüge gegeneinander verzögert werden oder Laser nur zu definierten Zeiten aktiv geschaltet werden. Technisch kann dies über die Kontrolle von elektrischen Synchronisationssignalen geschehen, oder direkt im optischen Strahlengang. Nicht jede Methode ist für jeden Laser und jede gewünschte Zeitauflösung geeignet.

Tabelle 3.1.: Varianten und Lösungen für die Zeitkontrolle zweier Laser.

	Pulszugverschiebung	Aktivschaltung
elektrisch	EDL	gating
optisch	ODL	AOM

Die generell langsamste in Tab. 3.1 gelistete Methode ist das optische Schalten mittels akusto-optischer Modulatoren, AOM. Der einfallende Laserstrahl wird im aktiven AOM an einer stehenden akustischen Welle gebeugt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist der Aufbau dieser Welle. Typische Kristallmaterialien wie TeO_2 erreichen dabei strahldurchmesserabhängige Schaltzeiten von $t_r = 160 \text{ ns/mm}$. Mit dieser langsamen Methode können dafür sämtliche Lasertypen kontrolliert werden.

Elektrisches „gating“ ist lediglich mit Diodenlasern möglich. Ist deren Treiber mit einem schnellen Eingang („fast gate“) ausgestattet, so können einzelne Pulse erzeugt werden. Die Reaktionszeit entspricht dem Pulsabstand bei der größtmöglichen Repetitionsrate; für 80 MHz sind das 12,5 ns.

Die einfachste elektrische Verzögerung („electrical delay line“, EDL) ist ein Kabel. Mit einer typischen Signalgeschwindigkeit von $2 \cdot 10^8 \text{ m/s}$ ergibt sich eine Verzögerung von 5 ns/m .

Für Messreihen ist eine kabelbasierte Lösung zu unflexibel und unpräzise. Eine passende Alternative sind elektronische Verzögerungsschaltungen wie in dem *Picosecond Delayer* (PSD) von *MPD*. Dort wird ein eintreffender elektrischer Puls aber nicht verzögert, sondern zum gewünschten Zeitpunkt ein neuer erzeugt. Die Mindestlaufzeit durch den PSD beträgt 12 ns, die maximale 62 ns. Der Bereich kann in Intervallen von 10 ps durchfahren werden. Voraussetzung für die Verschiebung ist eine Synchronisierung beider Laser, entweder durch einen gemeinsamen Oszillator oder eine Phasenregelschleife.

Die beste Auflösung bietet eine optische Verzögerung („optical delay line“, ODL), die den Weg eines der beiden Laser verlängert. Die Distanz wird mit Lineartischen variiert, die Positioniergenauigkeiten unter 100 nm erreichen. Daraus ergibt sich eine Auflösung im Femtosekundenbereich.

Ist es notwendig, den relativen Abstand zweier Laserpulszüge zueinander zu bestimmen, so kann dies mittels Kreuzkorrelation an zwei APDs realisiert werden. Durch passende Filter erreicht nur das Licht jeweils eines Lasers eine APD. Unter der Voraussetzung, dass der Strahlengang nach der Probe und der elektrische Weg nach den APDs für beide Laser derselbe ist, kann die Zeit zwischen zwei Pulsen an der Stelle des Maximums der Korrelationskurve abgelesen werden.

Dies ist für aktiv geschaltete Laser nicht möglich. Für einzelpulsgeschaltete Dioden lässt sich noch die absolute Zeit zwischen elektrischem Gatepuls und dem Laserpuls an der APD messen. Die Trigger für den AOM sind aufgrund der langen Schaltzeit zu breit für die Eingänge typischer Korrelationshardware.[90] In so einem Fall wird die Verzögerung aus Angaben zur Laufzeit der Elektronik lediglich berechnet.

3.3.2. Auslegung der Experimente

Mit dem Messaufbau soll es möglich sein, orts aufgelöste Doppelresonanzspektroskopie zu betreiben. Ein Ziel ist die Bestimmung des lokalen Sauerstoffgehaltes biologischer Proben durch orts aufgelöstes RISC. Ein weiteres die orts abhängige Untersuchung der Reaktionsgeschwindigkeit des ESPT. Wie in Abb. 3.1 angedeutet, müssen dafür unterschiedliche Messtechniken (rot) verwendet werden.

Dabei müssen einige Einschränkungen gemacht werden. Zunächst wird auf die Ortsauflösung verzichtet, bis gezeigt ist, dass die Messungen im Ensemble zufriedenstellend funktionieren. Aus demselben Grund werden die Laser vorerst nicht mit einer ODL gegeneinander verschoben. Schnelle Phänomene, mit Zeitkonstanten von einigen Pikosekunden und darunter, sind somit bis auf Weiteres ausgeschlossen. Insbesondere die Untersuchung des ESPT ist nicht für alle Photosäuren und Lösemittel möglich.[56, 91, 92]

Die unterschiedlichen Zeitskalen können nicht vom selben Aufbau abgedeckt werden, weshalb hier zunächst zwei Experimente realisiert werden. Die Verzögerung zweier Laserpulszüge gegeneinander ist technisch gelöst und es existiert kommerzielle Hard- und Software, sodass die Umsetzung vergleichsweise unkompliziert möglich ist. Für definierte Verzögerungen müssen beide Laser synchron laufen, also muss mindestens ein Laser einen externen Oszillator als Taktsignal akzeptieren. Die Verschiebung selbst wird mit einer variablen elektronischen Verzögerung (EDL) realisiert. Der maximale Messbereich liegt zwischen dem Abstand einzelner Pulse und der maximalen Verzögerung der EDL. Die Auflösung wird abhängig von den Lichtquellen durch deren Pulsbreite oder den Jitter der EDL bestimmt. Das Messsignal ist die verzögerungsabhängige Zählrate im beobachteten Zerfallskanal. Der Modus soll „Pikosekunden-Pump-Probe“ heißen, PSPP.

Die Untersuchung langsamerer Prozesse bedingt eine aufwendigere Steuerung. Im vorherigen Fall laufen die Laser bei einer konstanten Repetitionsrate. Für die vorhandenen Quellen bedeutet dies meist 80 MHz. Mit Pulsabständen von 12,5 ns lassen sich keine Phänomene untersuchen, die sich auf der Mikroskundenzeitskala abspielen. Hier muss eine der Aktivschaltungen aus Tab. 3.1 verwendet werden. Die Verschiebung von Pump- und Probesignal ist die Zeit zwischen der aktiven Phase der jeweiligen Laser. Sie wird durch ein Programm variiert, dass die unterschiedlichen Phasen synchron zu einem Taktgeber schaltet. Der maximale Messbereich wird nach unten durch eine Taktlänge des Messprogramms festgelegt, nach oben durch die Taktlänge mal der Breite des verwendeten Zählers.⁷ Die Taktlänge ist zugleich die maximale Auflösung dieses Modus. Im Gegensatz zum PSPP wird es hier unmöglich sein, den vollen Messbereich zu beproben. Zum einen diffundieren die gepumpten Moleküle aus dem Anregungsvolumen, was die maximale Beobachtungslänge auf ca. 100 μ s festlegt. Zum anderen müssen die Schaltzeiten aller angesteuerten Kompo-

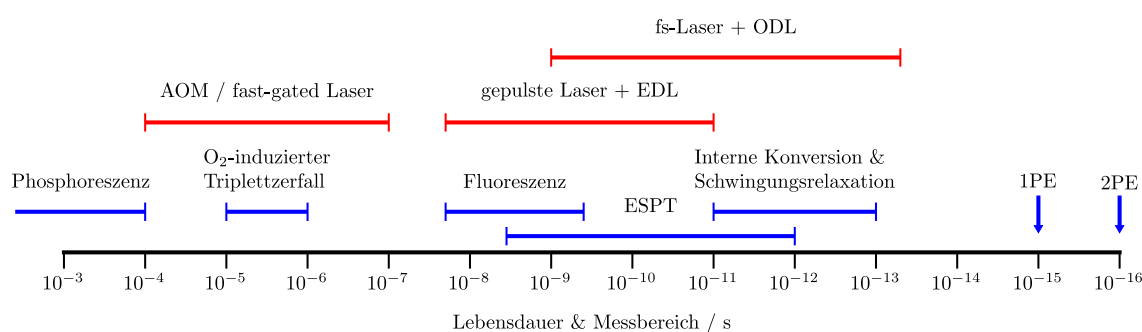


Abbildung 3.1.: Die Lebensdauern verschiedener photochemischer Prozesse (blau) und die Messbereiche verschiedener Pump-Probe-Verfahren (rot).

⁷Die Nichtbeachtung dieser Regel zieht folgenschwere Zählerüberläufe nach sich.[93]

nenten berücksichtigt werden. Durch den verwendeten AOM ergibt sich somit bei 1 mm Strahldurchmesser eine untere Schranke von 160 ns. Dieser Modus heißt – entsprechend der beobachtbaren Zeitskala – „Mikrosekunden-Pump-Probe“, MSPP.

Bei der Realisierung der Experimente sind drei zentrale Probleme zu lösen. Da verschiedene Laser zum Einsatz kommen, muss zunächst für deren Einkopplung in den Messaufbau und gegebenenfalls Stabilisierung gesorgt werden. Abschnitt 3.3.3 bis 3.3.5 erläutern dies. Doppelt angeregte Moleküle können nur dort beobachtet werden, wo sich die Anregungsvolumina von Pump- und Abfragepuls überschneiden. Sie müssen somit als nächstes überlagert werden. Die ökonomischste Art dies zu tun, wird in Abschnitt 3.3.6 beschrieben. Zuletzt muss neben der räumlichen für die zeitliche Überlagerung gesorgt werden. Dies ist für den PSPP einfach durch Verschiebung der Pulzüge gegeneinander möglich. Die Pulsfolge im MSPP wird dagegen durch ein Echtzeitsystem (Abschnitt 3.3.7) erzeugt, dass nicht mehr trivial zu programmieren (Abschnitt 3.3.9) ist.

3.3.3. Aufbau der Faserlaser

Für die Experimente stehen zwei *Toptica FemtoFiber pro* zur Verfügung. Der *NIR* und der *TVIS LRC* sind zwei Modelle einer Produktfamilie von Faserlasern. sie sind schematisch in Abb. 3.2 dargestellt. Die gemeinsame Stufe wird durch jeweils einen Ringoszillator (OS) und Verstärker (AMP) gebildet, zu denen jeweils eine nicht eingezeichnete Pumpdiode gehört. Das Lasermedium ist jeweils eine Erbium-dotierte Faser die bei 1560 nm emittiert. Durch die Kombination von passiver Modenkopplung durch einem sättigbaren Absorber (SAM) mit einem Siliziumprismenkompressor (Si) erreicht die Stufe Pulsbreiten unterhalb von

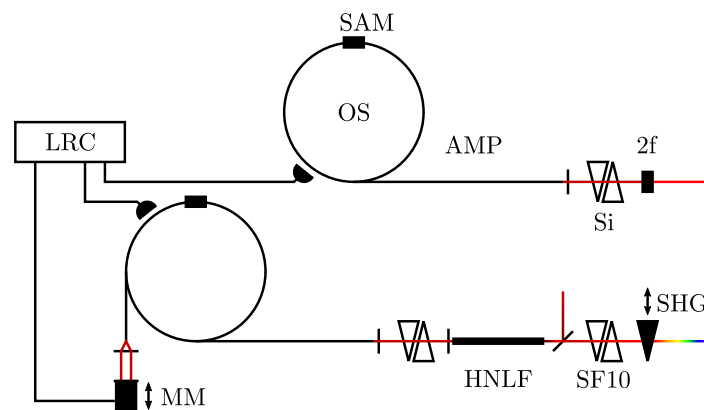


Abbildung 3.2.: Schematischer Aufbau beider Faserlaser. Der TVIS wird hier über das LRC-Modul mit dem NIR synchronisiert. Die Kürzel sind im Text erläutert. Schwarze Linien: Strahlengang innerhalb einer Faser; bunt: Freistrahlgang.

100 fs. Die Repetitionsrate von 80 MHz führt zu einer mittleren Leistung von über 300 mW. Zur Synchronisation wird an einem SMA-Anschluss die Repetitionsrate ausgegeben.

Die Option LRC (laser repetition rate control), erlaubt es, die Länge der Laserkavität über einen motorisierten Spiegel (MM) zu verändern. So kann die Repetitionsrate um etwa 200 kHz verschoben werden. Mit einer Phasenregelschleife (PLL, phase locked loop) wird sie schließlich mit einer zweiten Quelle synchronisiert.

Mit dem Zusatz NIR erhält der Laserkopf einen SHG-Kristall zur Frequenzverdopplung (2f) und emittiert bei 780 nm und einer mittleren Leistung von mehr als 100 mW. Abgesehen vom Prismenkompressor zur Pulsbreitenoptimierung kann der Laser nicht angesteuert werden. Während der Messungen ist die Ausgangsleistung auch ohne Änderung der Prismenposition stabil.

In der Variante TVIS wird in einer hochgradig nichtlinearen Faser (HNLF, highly nonlinear fiber) durch eine Mischung komplexer, nichtlinearer Phänomene ein Kontinuum erzeugt.[94] Die Variation der Pulsbreite mit den Siliziumprismen bestimmt die spektrale Verteilung des Kontinuums.[95] Dessen kurzwelliger Teil bei 980 nm bis 1400 nm unterliegt starker Dispersion, die mit einem SF10-Prismenkompressor korrigiert wird. Zuletzt werden die Laserpulse mit einem keilförmigen SHG-Kristall in den sichtbaren Bereich konvertiert. Durch die Keilform kann die effektive Kristalllänge verändert werden und somit die optimale Wellenlänge für die Frequenzverdopplung. Die Ausgangswellenlänge von 488 nm bis 640 nm wird manuell eingestellt, indem der Keil senkrecht durch den Strahl gefahren wird. Die maximal erreichbare Leistung ist frequenzabhängig und erreicht ihr Maximum von ca. 6 mW bei 550 nm. Während der Messungen stellt sich auch nach Stunden kein thermisches Gleichgewicht im Laser – insbesondere in der HNLF – ein. In Folge dessen muss der Siliziumprismenkompressor regelmäßig nachgeregelt werden, um die spektrale Verteilung

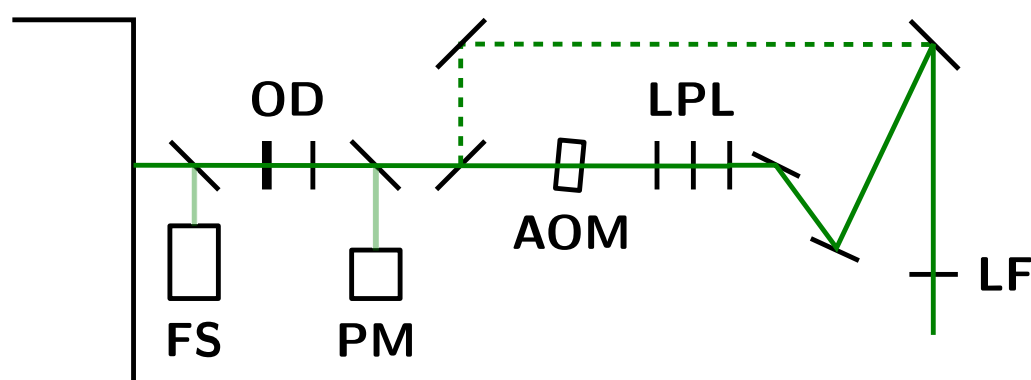


Abbildung 3.3.: Skizzierter Strahlengang des TVIS (links) mit den für den stabile Betrieb notwendigen Hilfsmitteln. Der Spiegel vor dem AOM ist klappbar, sodass dieser umgangen werden kann. Die Abkürzungen sind im Text erklärt.

für die eingestellte Ausgangswellenlänge zu erhalten. Die optimale Position wandert dabei mit längerer Betriebsdauer zu größeren Schrittmotorweiten.

3.3.4. Vorbereitung und Kontrolle des TVIS im Messbetrieb

Wie im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, läuft der NIR stabil und besitzt wenige Einstellmöglichkeiten, sodass der Laser ohne weitere Maßnahmen in fast jedem Aufbau genutzt werden kann. Ausgenommen sind MSPP-Messungen, da kein AOM für 780 nm vorhanden ist. Im Gegensatz dazu besitzt der TVIS empfindlichere und variable Baugruppen und benötigt zum optimalen Betrieb einige Hilfsmittel. Der resultierende Aufbau ist in Abb. 3.3 skizziert.

Zum Einstellen der Ausgangswellenlänge wird ein *S2000*-Faserspektrometer von *Ocean Optics* verwendet (FS). Mit der Reflexion des Laserstrahls an einer Glasplatte als Signal, kann die Wellenlänge kontinuierlich überwacht werden. Das frequenzverdoppelte Kontinuum wird gegenüber der eingestellten Wellenlänge lediglich um drei Größenordnungen unterdrückt (siehe Abb. A.1.2b). Zur Hintergrundminimierung muss also für jede gewünschte Wellenlänge ein schmalbandiger Filter (LF) verwendet werden. Die Wahl fiel auf zwei *Brightline HC* von *Semrock* mit Zentralwellenlängen von 532 nm bzw. 543 nm. Die Unterdrückung unerwünschter Wellenlängen relativ zur eingestellten Zentralwellenlänge steigt damit auf 10^{-9} .

Die Leistung des Lasers wird mit Graufiltern (OD) eingestellt und über eine weitere

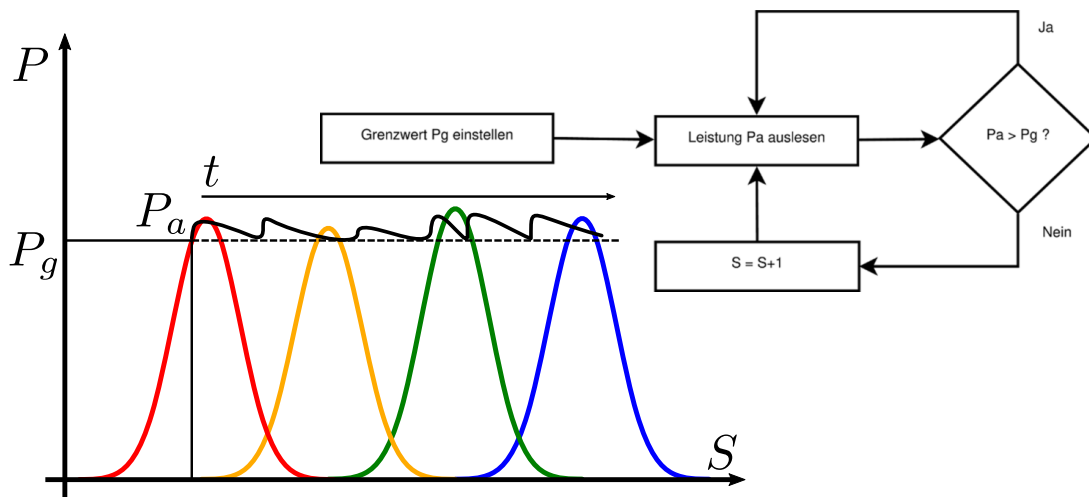


Abbildung 3.4.: Die optimale Prismenposition S wandert mit der Zeit zu größeren Werten. Die Ausgangsleistung kann durch den rechts oben dargestellten Algorithmus hinreichend konstant gehalten werden.

Glasplatte mit einer *Newport 819D-SL* Photodiode (PM) gemessen. Sie wird von einem *1936-C* ausgelesen. Mit Hilfe von zuvor erstellten Tabellen wird die Leistung auf der Probe über die reflektierte eingestellt.

Die dauerhafte Leistungsmessung ermöglicht es, die temperaturbedingten Leistungsschwankungen bei der Kontinuums-erzeugung auszugleichen. Die Nachregelung der Siliziumprismenposition übernimmt ein LabVIEW-Programm. Wegen des deterministischen Verhaltens des Lasers – mit zunehmender Zeit wandert die optimale Position zu größeren Werten – genügt eine einfache Nachregelung gemäß des Flussdiagramm in Abb. 3.4: Die Leistung P_a am Powermeter wird mit dem PC ausgelesen. Sinkt die Leistung unter einen definierten Schwellwert P_g , wird die Position des Schrittmotors um 1 erhöht.

Als Startpunkt wird eine Position von 40 Schritten unterhalb der Position bei maximaler Leistung gewählt. Die Maximalleistung schwankt mit der Zeit, und der einfache Algorithmus kann eine verminderte Maximalleistung nur auf diese Weise kompensieren. Abb. 3.4 veranschaulicht die mit der Zeit schwankende Ausgangsleistung P_a ; die minimale Schrittweite führt zu Leistungssprüngen von ca. 1 %.

Für die Experimente auf der Mikrosekundenskala wird der Laser durch einen AOM von *AA-Optoelectronic* moduliert. Der *MT110-A1-VIS* wird vom RF-Generator *MODA110-B51k-34* getrieben. Dessen Modulation beschränkt sich auf ein TTL-Signal, womit sich der AOM am schnellsten Ein- und Ausschalten lässt. Zur Zentrierung um den Strahl ist der AOM in der Ebene senkrecht dazu verschiebbar. Zur Maximierung der Beugeeffizienz ist er um den Strahl und parallel zur Tischebene rotierbar. Hinter dem AOM werden die transmittierten Strahlen mit einer Linse auf ein Pinhole fokussiert und wieder kollimiert (LPL in Abb. 3.3). Der AOM ist so rotiert, dass nur die erste Ordnung durch das Pinhole gelangt.

3.3.5. Weitere Laser und mögliche Kombinationen

Es stehen zwei weitere Laser für die Experimente zur Verfügung, *P-C-xxxB* Laserdioden aus der *LDH*-Baureihe von *Picoquant*. Die Dioden sind nach ihrer Emissionswellenlänge benannt. Die bei 405 nm emittierende Diode ist mit Repetitionsraten bis 40 MHz kompatibel. Ihre Maximalleistung liegt bei 3 mW, die leistungsabhängige Pulsbreite ist besser als 500 ps. Darüber hinaus emittiert diese dank der Auskopplung mit einer Multimodenfaser ein rundes Strahlprofil, im Gegensatz zum elliptischen der *P-C-635B*. Letztere ist bis 80 MHz sicher zu betreiben und erreicht dabei bis zu 8 mW bei Pulsbreiten unterhalb von 400 ps. Beide Dioden werden über eine Variante der *PDL 808 Sepia* gesteuert, die sowohl externe Taktsignale als auch schnelle Gate-Signale an den Lasertreibern akzeptiert.

Die Laser werden über einen Nahinfrarotspiegel (*Thorlabs BB1-E03*), und drei Strahlteiler (635 nm: *Chroma zt 640 rdc*; TVIS: *AHF 620 dcxr*; 405 nm: *AHF h 405 lpxr*) überlagert

Tabelle 3.2.: Die Kombinationsmöglichkeiten der zur Verfügung stehenden Laser für den MSPP- (M) bzw. PSPP-Modus (P).

	P-C-405B	P-C-635B	TVIS	NIR
P-C-405B		(P & M)	M	
P-C-635B	(P & M)		P & M	P
TVIS	M	P & M		P
NIR		P	P	

(siehe Abb. 3.5). Die resultierenden Transmissionseffizienzen sind in Abb. A.1.3 dokumentiert. Für die Messungen wird ein Konfokalmikroskop (vgl. Abschnitt 3.3.6) genutzt. Die Kombinationsmöglichkeiten werden damit von den beiden zur Trennung von Anregung und Fluoreszenz genutzten Strahlteiler *Chroma zt 532-640-NIR rpc* und *zt 405-488-543 rpc* bestimmt. Aus deren Transmissionsspektren in Abb. A.1.4 und Abb. A.1.5 geht hervor, dass die Laserdioden nur bedingt zusammen benutzt werden können. Der *zt 532* transmittiert im fraglichen Spektralbereich bis zu 10 %. Darüber hinaus ist die blaue Diode nicht für 80 MHz ausgelegt und kann somit nicht mit den Faserlasern im PSPP betrieben werden. Der MSPP wiederum scheidet für den NIR aus, da kein passender AOM angeschafft wurde. Es verbleiben die fünf in Tab. 3.2 dargestellten Wellenlängenpaare von 405 nm/543 nm und 532 nm/635 nm für den MSPP-Modus sowie 532 nm/635 nm, 532 nm/780 nm und 635 nm/780 nm für den PSPP-Modus. Dabei ist zu beachten, dass die hohe Pulsintensität des NIR Zweiphotonenanregung bei einer effektiven Wellenlänge von 390 nm ermöglicht.

3.3.6. Konfokalmikroskopie

Die Strahlführung erfolgt über *Thorlabs BB1-E02*-Spiegel. Ausgenommen davon ist der NIR, der bis zu den Strahlteilern über besser geeignete Spiegel (*BB1-E03*) geleitet wird. Die Justage erfolgt mit *Star SR100-100-2-BU* Spiegelhaltern von *Liop-tec*. Sie unterliegen einer zwar geringen, aber merklichen thermischen Drift, sodass vor jeder Messung das aus Tab. 3.2 gewählte Laserpaar neu in das für die Messungen verwendete *Axiovert 200* Mikroskop von *Zeiss* überlagert werden muss. In Abb. 3.5 ist schematisch der Strahlengang für die Messungen dargestellt.

Auch für Ensemblemessungen wird konfokal detektiert, um Streulicht aus Ebenen zu unterdrücken, die nicht im Fokus liegen.[96] Die Apertur im Anregungsstrahlengang entfällt durch die kollimierte Beleuchtung durch die Laser, die über den Strahlteiler (DS) auf die Probe hinter dem Objektiv (*Zeiss C-Apochromat 40x 1,2W Korr ∞ 0,14 – 0,18*) geleitet wird. Alles durch das Objektiv in Rückstreuung gesammelte Licht gelangt über einen Spiegel

(S) und eine Tubuslinse (TL) auf die Detektionsapertur (PH).

Wird diese Apertur so klein gewählt, dass sie einer Airyeinheit (Durchmesser der Airyscheibe[97]) bei der geringsten Wellenlänge entspricht, wird nur der zweifach beleuchtete Probenbereich auf den Detektor projiziert. Das Produkt zweier radialer Verteilungsfunktionen der Laserintensität, $I_\lambda \propto \left(\frac{2J_1(r)}{r}\right)^2$, erhält nur das erste Maximum der Besselfunktion J_1 , siehe Abb. A.1.6. Das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis (SNR, signal to noise ratio) kann so durch Streulichtunterdrückung ohne Zählratenverlust verbessert werden. Liegt die kleinste Wellenlänge bei 532 nm, folgt mit dem 40-fach vergrößernden Objektiv ein Durchmesser von $d_{PH} = 1,22 \times 532 \text{ nm} \times 40 \times 1,2^{-1} = 21,6 \mu\text{m}$.

Die vorherige Überlegung gilt jedoch nur für beugungsbegrenzte Abbildung, sodass in der Praxis geringe Aperturgrößen einen starken Abfall der Zählrate verursachen. Die Apertur wird mit $d_{PH} = 50 \mu\text{m}$ tatsächlich so groß gewählt, dass ihre Projektion in die Probenebene größer ist, als die Airyscheibe aller Laser.

Nach der Apertur wird das von der Probe kommende Licht von einer *Thorlabs LA1131-A* Linse mit 50 mm Brennweite (L) kollimiert. Ein *HQ 590-70* Filter von *AHF* (F) lässt nur die gewünschte Fluoreszenz passieren. Wird der NIR mit mehr als einem Milliwatt Leistung verwendet, muss zusätzlich ein *BG39* von *Schott* eingesetzt werden. Eine weitere *LA1131-A* fokussiert die Fluoreszenz auf den Detektor (D), eine *Perkin Elmer SPCM AQRH 14* APD.

Die radiale Überlagerung der Laser in der Probe lässt sich einfach herstellen: Mit eingebautem Objektiv werden die Reflexionen der Laser an einem Deckglas mit einer CCD-Kamera

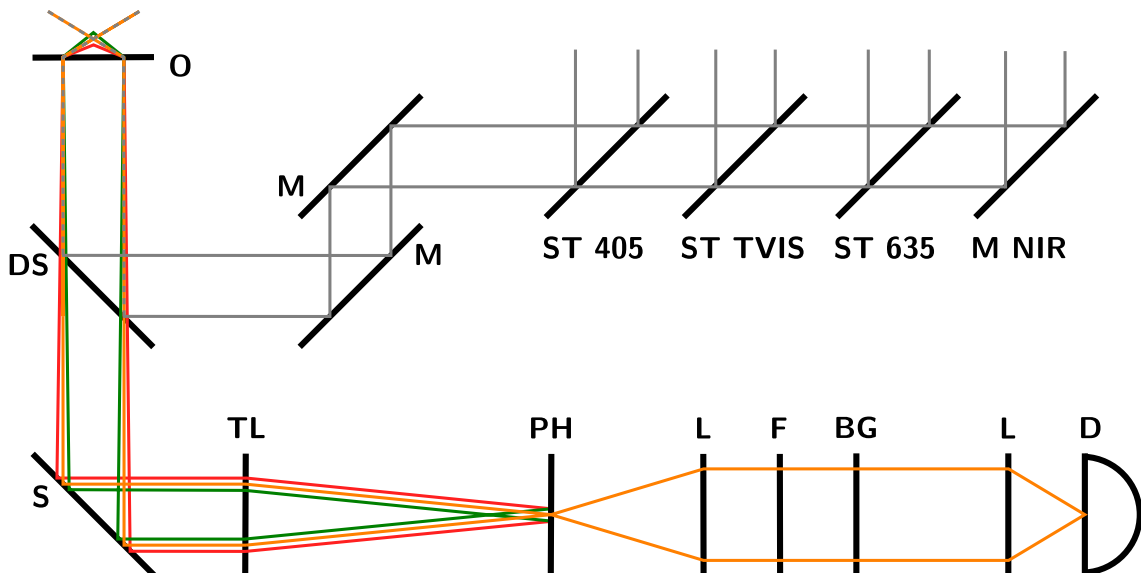


Abbildung 3.5.: Der konfokale Strahlengang für die Doppelresonanzspektroskopie.

beobachtet. Haben die Mittelpunkte der Querschnitte beider Laser an beiden Deckglasgrenzflächen dieselben $(x - y)$ -Koordinaten, gehen sie gerade und lateral überlagert durch das Objektiv. Die axiale Justage, die trotz des verwendeten Apochromaten nötig ist, erfordert eine Möglichkeit zur Divergenzkorrektur eines der Laser.

In einen Strahlengang wird ein 1:1 Keplerteleskop aus zwei *LA1131-A* Linsen mit 50 mm Brennweite eingebaut. Durch den Abstand der Linsen lässt sich nun die Divergenz und somit die axiale Fokusposition des gewählten Lasers bestimmen. Als Kriterium für optimale Justage wird die Fluoreszenzerhöhung durch RISC in sauerstofffreier Lösung von MC540 in Ethanol genutzt. Die laterale Position wird erneut am Deckglas überprüft und falls notwendig durch Mikrometerschrauben an den Linsenhaltern korrigiert. Die 635 nm-Diode wird mit einem 2:1 Teleskop verwendet. Dazu wird eine Linse gegen eine *Thorlabs SC254-100-A-ML* mit 100 mm Brennweite getauscht. Ziel der Vergrößerung ist eine gleichmäßigere Ausleuchtung des Objektivs durch den elliptischen Strahl.

Eine präzisere Strahlüberlagerung wird durch Piezoaktoren erreicht.[98]. Sie wird in der Regel durch 3D-Rastern fluoreszierender bzw. streuender Kugeln überprüft.[50] Da mit dem *SCX-200*-Modul der *Picoquant TimeHarp 200* nur ein 2D-Scanner zur Verfügung stand, war die Kontrolle der kritischen axialen Überlagerung auf diese Weise nicht möglich.

3.3.7. Echtzeitsysteme und programmierbare Logik

Ein Echtzeitsystem, wie es für die Steuerung des MSPP benötigt wird, ist im Allgemeinen eine Steueranlage, die garantiert, dass bestimmte Prozesse in bestimmten Zeiteinsparungen ablaufen. Ein gerne genutztes Beispiel sind Airbagsteuerungen in Fahrzeugen, bei denen Kollisionsereignisse innerhalb weniger Millisekunden bewertet werden müssen. Diese Aufgabe wird nicht dem Bordcomputer überlassen, da dessen scheduler[99] mangels Priorisierung die benötigte CPU-Zeit im falschen Moment anderweitig vergeben kann. Eine billige und sichere Lösung für die benötigten Reaktionszeiten sind Mikrocontroller, die durch eine Software an die jeweilige Aufgabe angepasst werden.

Die größte sinnvolle Beobachtungslänge im MSPP ist, bestimmt durch Diffusion, 100 μ s. Für eine hinreichende Messgenauigkeit muss die Steuerelektronik demnach im Mikrosekundentakt und schneller arbeiten. Diese Anforderungen an die Präzision können hardwarenah programmierte Mikrocontroller nicht garantieren; die Funktionalität muss unmittelbar durch die Hardware gegeben sein.[100] In solchen Fällen werden ASICs (application specific integrated circuit) genutzt, beispielsweise für die Verarbeitung von Satellitennavigationsdaten.[101] ASICs haben zwei große Nachteile: Einmal produziert lassen sich nicht mehr ändern und die Entwicklungskosten für ein Design sind hoch. Beides wird durch die Verwendung von programmierbarer Logik (PLD, programmable logic device) umgangen.

PLDs lassen sich auf unterschiedliche Arten realisieren. Ist es notwendig, die Durchlaufzeiten der Logik exakt zu kennen, werden CPLDs (complex programmable logic devices) genutzt.[102] Dementsprechend erzeugt der *MPD Picosecond Delayer* die Zeitverschiebung des Ausgabesignals mit einem CPLD (*Atera MAX II*).[103] Für komplexere Aufgaben werden FPGAs (field-programmable gate array) genutzt.[104] Die namensgebende programmierbare Logik liegt hier in Blöcken vor, die flexibel miteinander verschaltet werden können. FPGAs werden zum Bau von Autokorrelationshardware verwendet. In der *Picoquant Time-Harp 200* ist z.B. ein FPGA aus der *Spartan*-Baureihe von *Xilinx* verbaut.

FPGAs werden mit Hardwarebeschreibungssprachen wie VHDL (Very High Speed Integrated Circuit Hardware Description Language) programmiert.[105] Diese Sprachen unterscheiden sich konzeptionell von den bekannten imperativen Sprachen wie C. Zudem muss darauf geachtet werden, dass der Code synthetisiert, also auf die Hardware übertragen, werden kann. Nicht zuletzt steigt der Codeumfang auch für recht simple Aufgaben unverhältnismäßig stark an.[106]

3.3.8. Soft- und Hardware zur Experimentsteuerung

Um den Programmieraufwand gering zu halten, wird ein *myRIO-1900* von *National Instruments* verwendet. Die Programmierung in *LabVIEW* (LV) ist gut dokumentiert und eignet sich für die Steuerung wissenschaftlicher Experimente. Mit der gewöhnlichen LV-Umgebung lassen sich nur Abläufe auf einem Host-PC entwickeln. Die RIO-Plattform ergänzt beide im vorherigen Abschnitt erwähnten Echtzeitebenen.

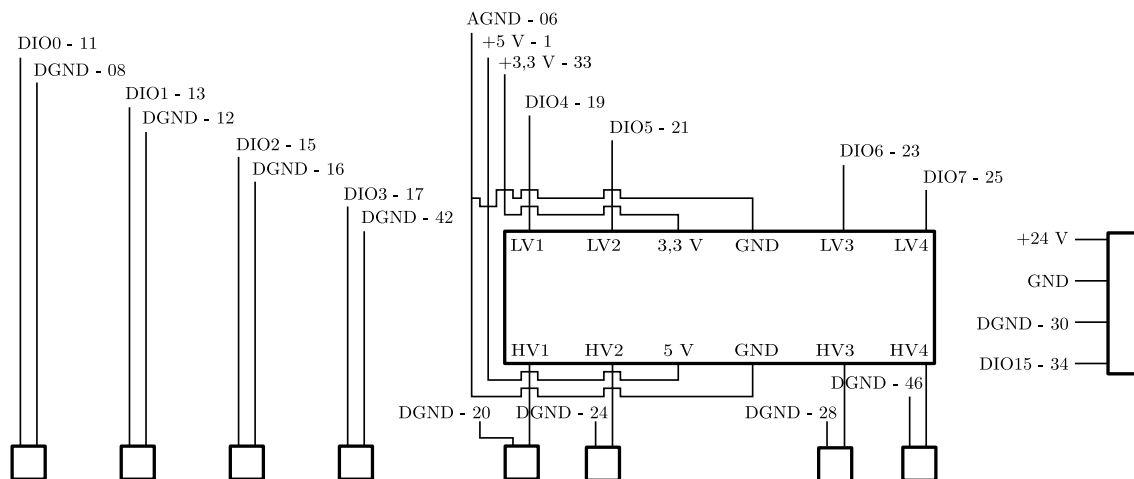


Abbildung 3.6.: Schaltplan der Anschlussbox für den myRIO. Die Quadrate stehen für SMA-Buchsen, das Rechteck rechts für den DB-15-Anschluss zum AOM-Treiber.

Dazu läuft auf dem myRIO ein echtzeitoptimiertes linuxoides Betriebssystem, in dem das *LabVIEW Real Time* Modul (LVRT) ausgeführt wird. Der FPGA ist ein *Xilinx Artix-7* und wird mit LVFPGA angesprochen, einem LabVIEW-Modul, das die Hardwarebeschreibung auf graphisches Programmieren mit LV zurückführt. LVRT wird hier zur Signalverarbeitung genutzt, während LVFPGA die präzise Zeitsteuerung in Hardware ermöglicht.

Die digitalen Schnittstellen des *myRIO-1900* gehören zur LVTTTL (low voltage transistor transistor logic) Logikfamilie. Sie wird mit 3,3 V Versorgungsspannung betrieben. Damit TTL-Anschlüsse mit 5 V Versorgungsspannung zuverlässig die hohen Pegel an myRIO-Ausgängen erkennen, werden vier davon mit einem *SparkFun Logic Level Converter - Bi-Directional* konvertiert. Zum Anschluss der APDs, der Gatesignale und des AOM-Treibers ist es zweckmäßig, die filigranen Pins des myRIO dauerhaft auf SMA-Buchsen zu legen. Dazu wird eine Anschlussbox konstruiert, deren Schaltplan in Abb. 3.6 gegeben ist. Jede SMA-Buchse ist an einen eigenen digitalen konfigurierbaren Ein- und Ausgang (DIO-x) und einen eigenen Erdungseingang (DGND-x) angeschlossen.

Ein Problem besteht beim Anschluss zweier APDs an den myRIO. Beide genutzten Kanäle zeigten zunächst dieselbe Zählrate an, auch wenn eine APD abgeschaltet war. Nach Rücksprache mit dem NI-Support wurden verschiedene Erdungsanschlüsse gepaart. Das Übersprechen reduziert sich deutlich, wenn beispielsweise DGND-8 und DGND-16 kombiniert werden. Zählraten jenseits der 10^5 cps erzeugen jedoch weiterhin Signale im jeweils anderen Kanal. Die kuriose Umgehung des Problems ist der zusätzliche Anschluss beider Gate-Eingänge der APDs an 5 V-Anschlüsse der Box. Ihre eigentliche Funktion, die APDs in Messpausen abzuschalten, können die Gates nicht erfüllen, da die Schaltströme des myRIO zu gering sind. Die zusätzliche Erdung verhindert aber das Übersprechen der Kanäle bei allen für die APDs sicheren Zählraten.

3.3.9. Programmierung

Abb. 3.7 stellt den Programmablauf beider Messmodi schematisch dar. Die Grafik lässt sich auf mehrere Arten teilen. Ein vertikaler Schnitt unterscheidet PSPP und MSPP. Ein horizontaler Schnitt zwischen „Host“ und „Real Time“ ist die Grenze zwischen PC und myRIO. Überhalb von „Host“ liegt die Benutzeroberfläche, der für den Anwender zugänglichen Teil des Programms, darunter die automatische Datenerfassung und -verarbeitung.

Die dicken Pfeile symbolisieren den Fluss von Messdaten, die dünnen den von Steuerdaten.

Möchte der Nutzer im PSPP Laserpulszüge gegeneinander verschieben, legt er in der Programmauswahl drei Messparameter fest. Dies sind die Zeitspanne, in der bei gleicher Verzögerung die Fluoreszenz integriert wird, die maximale Verzögerung, die der PSD erreichen soll und das Inkrement, mit dem die Verzögerung erhöht wird. Minimales Inkrement

und maximale Verzögerung sind durch die PSD mit 10 ps bzw. 50 ns vorgegeben. Bei Bedarf kann die initiale Verzögerung des PSD eingestellt werden.

Danach werden die Programmteile gemäß den Einstellungen gestartet, wobei der FPGA lediglich Signale der angeschlossenen APD auswertet, die für jedes registrierte Photon einen elektrischen Puls ausgibt. Die Abfragerate für den APD-Eingang beträgt 200 MHz, die relativen Ankunftszeiten der Photonen sind also bis auf 5 ns bekannt. Aus der Zeit zwischen den Pulsen wird in der RT-Ebene alle 100 μ s die Zählrate berechnet.⁸ Der Host berechnet den Mittelwert der Zählraten und speichert diese gemeinsam mit dem genauen Verlauf in eine Datei.

Wie in Abschnitt 3.3.2 bereits angedeutet, nutzt der PSPP-Modus Echtzeitfähigkeiten nur in begrenztem Maße. Die eigentliche Experimentsteuerung findet auf der Hostebene statt.

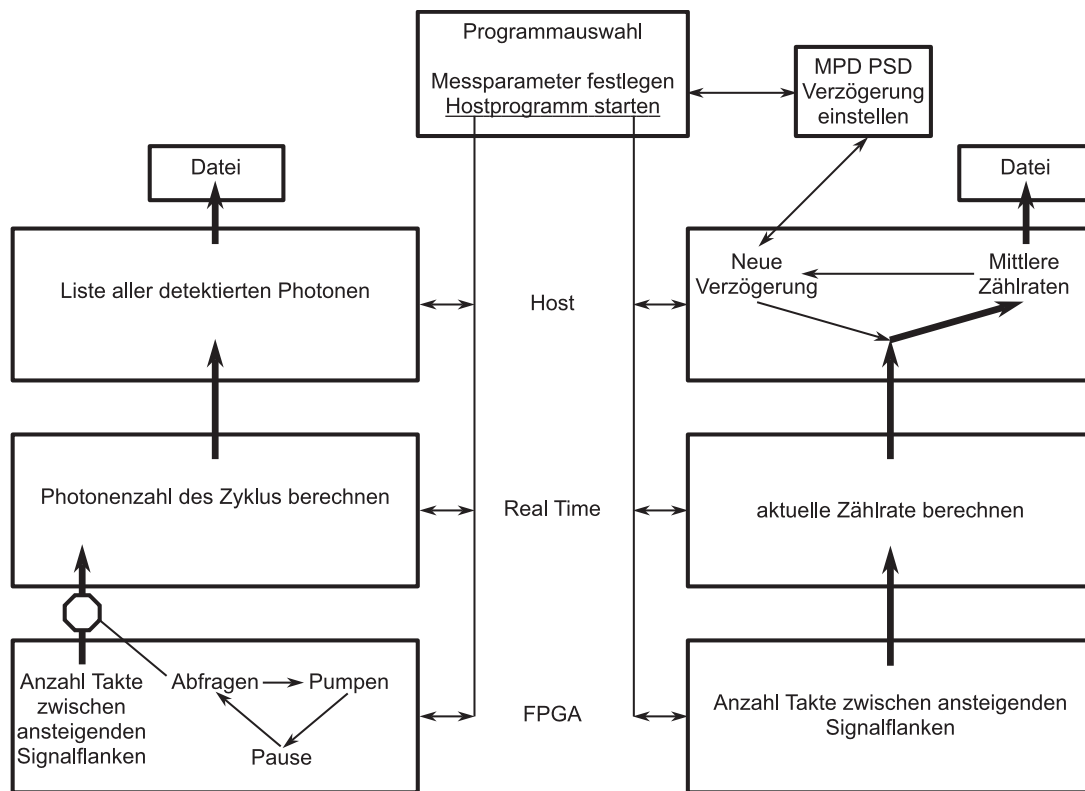


Abbildung 3.7.: Das Flussdiagramm für den MSPP-Modus (links) und den PSPP-Modus (rechts).

⁸Da die Abstände aufeinanderfolgender Photonen bekannt sind, ließe sich sogar Fluoreszenzkorrelationspektroskopie betreiben. Mit den 40 zur Verfügung stehenden Eingängen sind auch Kreuzkorrelationen kein Problem. So könnte dedizierte Korrelationshardware eingespart werden.[107]

Die Abfolge aus Pumpen und Abfragen des MSPP hingegen wird direkt im FPGA gesteuert. In der Benutzeroberfläche muss zunächst festgelegt werden, ob der TVIS als Pump- oder Abfragelaser verwendet wird, da der Kanal für den AOM nicht geändert werden kann (vgl. Abb. 3.6). Die Nutzerin muss weiterhin die Pausen zwischen den Pulsen vorgeben, indem wie bei dem PSPP die maximale Wartezeit und das Inkrement übergeben werden. Untere Grenze ist automatisch eine Pause von 0 s. Zusätzlich muss die Pump- und Abfragezeit bestimmt werden, die zuvor durch die Laserpulsbreiten gegeben waren. Anstatt einer Zeitspanne zur Signalintegration wird die Anzahl der Wiederholungen pro Wartezeit vorgegeben.

Auch in diesem Modus werden Photonenabstände mit 200 MHz detektiert. Die Schleife für die Experimentsteuerung läuft auf demselben FPGA allerdings mit nur 160 MHz. Dies wird durch eine längere Abfolge an Instruktionen verursacht, die in Hardware nicht in 5 ns abgearbeitet werden kann. Bedingt durch die Taktrate akzeptiert die Benutzeroberfläche nur Zeitparameter in Vielfachen von 6,25 ns.

Um Hintergrundphotonen bestmöglich zu vermeiden, wird die Weitergabe detektierter Pulse nur während der Abfrage zugelassen. Damit die Photonen den Verzögerungen zugeordnet werden können, wird die aktuelle Pausenlänge als Metadatum mit übertragen. In der RT-Ebene werden die Photonenereignisse summiert und vom Host in eine Datei gespeichert.

Ursprünglich konnte die Länge der Abfragezeit nicht direkt bestimmt werden und orientierte sich mit 200 μ s an der Diffusion der Farbstoffe durch das aktive Volumen. Mit den wieder gemessenen Photonenabständen sollten Kurven für den Zerfall der Triplettpopulation unter Bestrahlung aufgenommen werden. Dazu müssten pro Zyklus mehrere Photonen gemessen werden, was bei einzelmolekülnahen Konzentrationen nicht möglich ist (vgl. Abschnitt 4.2.3). Die APD kann mangels geeigneter Anschlussströme auch nicht geschaltet werden, weshalb höhere Konzentrationen während der Sättigungsphase zu Zählraten jenseits der Belastungsgrenze von 10^7 1/s führen.

Um nichtsdestotrotz Messungen bei niedrigen Konzentrationen zu ermöglichen, wurde die Datenverarbeitung in der RT-Ebene vereinfacht, sodass dort nur Photonen gezählt werden. Ohne die ursprüngliche Struktur des Programms grundlegend zu ändern, kann die Abfragezeit nicht kleiner als 20 μ s sein. Ein Konzept für diese Änderungen existiert, konnte jedoch nicht mehr umgesetzt werden.

3.4. Zeitaufgelöste 2PE-Fluoreszenzanisotropie

3.4.1. Versuchsaufbau

Für die Messung der zeitaufgelösten 2PE-Anisotropie ist der in Abb. 3.8 gezeigte Strahlengang nötig. Üblicherweise ist der *Toptica FemtoFiber pro NIR* (NIR) über Justierspiegel

(*Thorlabs BB1-E02*) und Dichroitspiegel in einen flexiblen Aufbau eingebunden, der die Verwendung mehrerer Anregungslaser zulässt. Dieser musste abgewandelt werden, da die verwendeten Spiegel eine zirkulare Polarisation nicht erhalten.

Der NIR nutzt eine Erbium-dotierte Faser als Lasermedium. Die fundamentale Emission bei 1560 nm wird frequenzverdoppelt, sodass er bei 780 nm emittiert. Der Strahl ist parallel zur Tischebene (H-) polarisiert, der Polarisationsgrad beträgt laut Datenblatt 95 %. Für linear polarisierte Messungen wird die Polarisation nach der Umleitung über M zunächst mit einem $\lambda/2$ -Plättchen in die Normale (V) gedreht und danach der verbleibende H-Anteil mit einem Polarisationsprisma (Pr) entfernt. Alternativ wird zunächst mit Pr die V-polarisierte Emission entfernt und dann mit einem $\lambda/4$ -Plättchen (*Thorlabs AQWP05M-980*) zirkular polarisiertes Licht erzeugt.

Die Polarisation wird mit einem *FDP-203*-Polarisator von *Jasco* und dem von *Newport* hergestellten Powermeter *1936-C* mit dem Thermopiledetektor *818P-001-12* eingestellt. Im linearen Fall wird der Polarisator in H-Position gebracht und das $\lambda/2$ -Plättchen so gedreht, dass die Leistung am Powermeter verschwindet. Bei zirkularer Polarisation wird das $\lambda/4$ -Plättchen so eingestellt, dass die Leistung für jede Polarisatorstellung dieselbe ist. Das polarisierte Laserlicht wird von der Linse Lf in die Probe S fokussiert. Die Fluoreszenz wird im rechten Winkel dazu mit der Linse Ls gesammelt. Die Brennweite beider Linsen ist $f_L = 50$ mm. Zwei Filter (F) entfernen Streulicht der Anregung. Die Filter sind ein

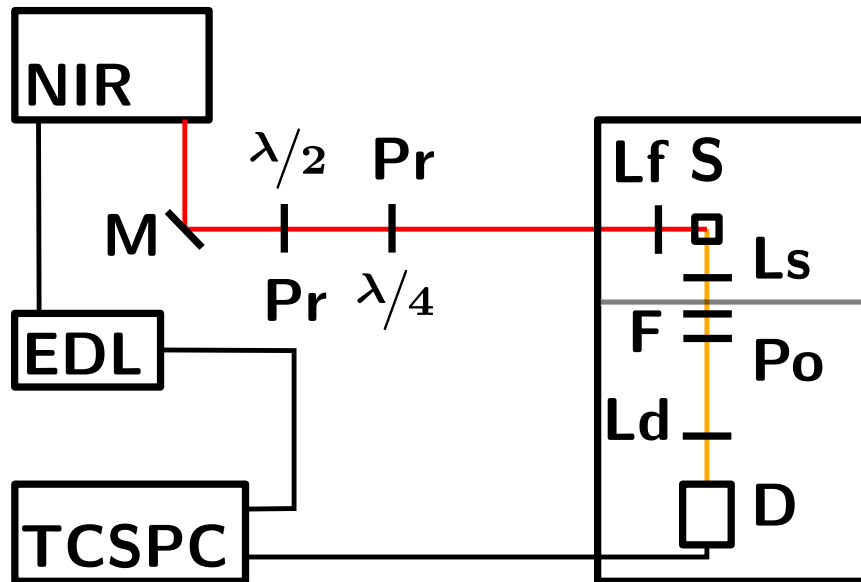


Abbildung 3.8.: Schematische Darstellung des Strahlengangs zur Aufnahme zeitaufgelöster Anisotropie. $\lambda/2$ /Pr und Pr/ $\lambda/4$ werden alternativ verwendet, für lineare bzw. zirkulare Polarisation. Die Kürzel werden im Text erläutert.

3 mm dicker *BG39* von *Schott* mit einer Unterdrückung von 10^{-13} bei 780 nm[108] und ein *HQ 590-70* von *AHF*. Letzterer wird vor die einzige Eintrittsöffnung eines Gehäuses aus schwarzem PMMA geschraubt, das den Detektionsstrahlengang umschließt. Zur Vermeidung anderweitig eingebrachten Streulichtes wird zusätzlich der Probenbereich mit zuschneidbaren Lichtschutzplatten umgeben.

Ein weiterer *FDP-203* (Po) ermöglicht parallele, senkrechte und Magic-Angle-Detektion. Für linear polarisierte Anregung bedeutet parallele Detektion, dass Po parallel zur Anregungspolarisation steht, im zirkularen Fall parallel zu Ausbreitungsrichtung (vgl. Abschnitt 2.2.3). Der Magic Angle für zirkuläre Polarisation liegt dementsprechend bei $\Theta_M^c = 35,3^\circ$ gegen die Normale, statt $\Theta_M^l = 54,7^\circ$.

Die dritte Linse Ld ($f_L = 50$ mm) fokussiert die Fluoreszenz auf eine Avalanche Photodiode (D) von *MPD*, eine *PD1CTC*. Sie wandelt schließlich die eintreffenden Photonen in elektrische Pulse.

Zeitgleich mit jedem Laserpuls wird vom NIR ein elektrischer Puls als Synchronisationssignal ausgesandt. Konstante Verzögerungen durch Unterschiede zwischen der Laufzeit des Lichts bis zur Probe und dem elektrischen Signalweg können mit dem *Picosecond Delayer* von *MPD* (EDL) ausgeglichen werden. Beide Pulszüge werden von einer *PicoHarp 300* von *PicoQuant* (TCSPC) zu Histogrammen mit relativen Detektionszeiten verarbeitet und auf dem Messrechner gespeichert.

Zur Messung von 1PE-Spektren wird der in Abschnitt 3.3.3 genauer beschriebene, auf 543 nm eingestellte *Toptica FemtoFiber pro TVIS* verwendet.

3.4.2. Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen, TCSPC

TCSPC-Kurven sind Histogramme, in denen die Zeiten zwischen der Anregung einer fluoreszierenden Probe durch einen Laserpuls und der Detektion des ersten von diesem Puls erzeugten Fluoreszenzphotons aufgetragen werden.[109] Aus diesen Histogrammen kann das Zerfallsgesetz für die Fluoreszenz, $I(t)$, gewonnen werden. Der Zeitpunkt der Anregung

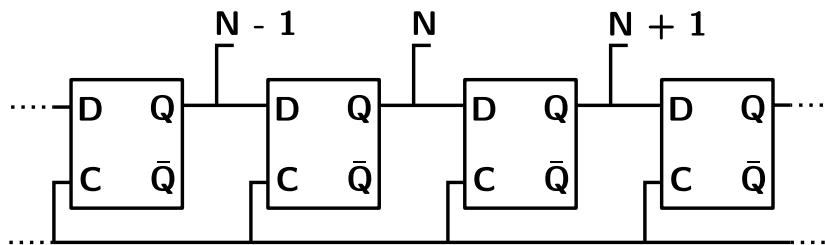


Abbildung 3.9.: Prizipschaltbild der Flipflopkette. D bzw. C sind Daten- und Taktsignal, Q (\bar{Q}) ist der (invertierte) Ausgang und N die Anzahl durchlaufener Flipflops.

wird der Messelektronik durch das elektrische Synchronisationssignal des Lasers angezeigt, die Ankunft des ersten Photons durch ein Signal einer APD oder eines Photomultipliers. Die Zeit zwischen den Signalen wird von einem Zeit-zu-digital Konverter (TDC, time-to-digital converter) gemessen. Eine einfache Methode dafür ist eine Serienschaltung von D-Flipflops[100] wie in Abb. 3.9. Die Synchronisationspulse des Lasers dienen dabei als unverzögertes Taktsignal mit der Frequenz f_{Rep} . Jeder Flipflop verzögert die Photonenpulse, die als Datensignal behandelt werden. Bei Koinzidenz von Daten und Takt an einem Flipflop wird die Kette unterbrochen und aus der Anzahl der erfolgreich durchlaufenen Flipflops kann eine Zeit t_{gem} abgeleitet werden.[110] Aufgrund des Messprinzips ist dies die Zeit zwischen der Detektion des Fluoreszenzphotons und dem darauf folgenden Puls, sodass die gesuchte Zeit $t = 1/f_{Rep} - t_{gem}$ ist. Die minimale Breite der Histogrammspalten wird also von der Verzögerung des einzelnen D-Flipflops bestimmt. Auf Flipflopserien basieren viele aktuelle Realisierungen von TDCs; soll aber eine hohe Zeitauflösung (≈ 10 ps) mit einem Messbereich von mehreren Nanosekunden verbunden werden, sind fortschrittliche Konzepte notwendig.[111] Daher nutzt die *PicoHarp 300* ein nicht näher beschriebenes Prinzip unter Verwendung zweier unabhängiger TDCs.[90]

Die zuvor genannten Signalweiterleitungen und -umwandlungen erzeugen Fehler bei der Bestimmung von t . Hinzu kommt noch die zeitliche Breite der Laserpulse. Die Fehler äußern sich wie folgt: Photonen, die dem Erzeugungszeitpunkt t zugeordnet werden, wurden im idealen Fall tatsächlich zu dieser Zeit erzeugt. Die Zuordnung von Photonen und Erzeugungszeitpunkt ist eine δ -Distribution. Das Zerfallsgesetz $I(t)$ ist gemäß

$$g(t) = \int_0^t dt' \delta(t') I(t - t') = I(t - 0) \equiv I(t) \quad (3.1)$$

genau gleich der im Experiment gemessenen Funktion $g(t)$. Im realen Fall wird die δ -Distribution ersetzt durch die Instrumenteantwortfunktion (IRF, instrument response function). Sie ist demnach ein Maß für die Unsicherheit des Erzeugungszeitpunktes einzelner Photonen. Die gemessene Funktion entspricht der Faltung des Fluoreszenzzerfalls mit der IRF.

$$g(t) = \int_0^t dt' \text{IRF}(t') I(t - t') = (\text{IRF} * I)(t) \quad (3.2)$$

3.4.3. Bestimmung der IRF

Zur Rekonstruktion von $I(t)$ in (3.2) muss die IRF bekannt sein. Die einfachste Möglichkeit zur Messung dieser ist den Anregungslasers auf den Detektor zu lenken, bspw. durch Streuung an einer Ludoxlösung. Für 2PE-Experimente kann es ratsam sein, einen nichtlinearen Streuprozess zu nutzen, da die zeitabhängige Intensität der Pulse bei Prozessen zweiter Ordnung quadratisch⁹ in die IRF eingeht. Habenicht et. al. haben in [113] die Vorteile von Hyper-Rayleighstreuung[114] an Goldpartikeln gezeigt, gerade wenn Lebensdauern ≤ 3 ns bestimmt werden sollen.

Wenn wie hier eine APD zur Detektion zum Einsatz kommt, wird die IRF wellenlängenabhängig und Streuung ist zur Bestimmung ungeeignet. Üblicherweise wird dann ein Farbstoff mit sehr geringer Lebensdauer verwendet, der im passenden Wellenlängenbereich emittiert.[115, 116] Dessen nicht verschwindende Lebensdauer stellt wiederum eine neue Fehlerquelle dar; die optimale Lösung ist also nicht mehr eindeutig.

Da hier der durchstimmbare *FemtoFiber pro TVIS LRC* von *Toptica* zur Verfügung steht, kann dieser zur IRF-Bestimmung verwendet werden. Eingestellt auf die Zentralwellenlänge des verwendeten Bandpassfilters (hier 590 nm), gibt seine Streuung die Transmission der Fluoreszenz durch den Bandpass so genau wie möglich wieder. Die Streuung ist linear, nicht quadratisch, was wegen des viel größeren Beitrages der Detektor-IRF im Vergleich zu der des Lasers das geringere Problem darstellt; die IRF eines *PD1CTC* hat eine Breite von ca. 50 ps, die Laser eine Pulsbreite von ≈ 100 fs. Die für das System aus TVIS, APD und PicoHarp gemessene IRF bei paralleler Polarisatorstellung (VV) ist in Abb. A.1.11 dargestellt. An dieser Stelle nicht wiedergegebene Messungen zeigen, dass die IRF unabhängig von der Polarisation der Anregung ist.

Können die Beiträge zur IRF als gaussförmig angenommen werden, so gilt für die addierte Halbwertsbreite $\sigma_{ges} = \sqrt{\sum_i \sigma_i^2}$. Die wesentlichen Beiträge zur IRF stammen von der APD, der elektrischen Verzögerungseinheit (EDL) und der Messelektronik (TCSPC). Die Quadratwurzelsumme von $\sigma_{APD} \approx 50$ ps, $\sigma_{EDL} \approx 5$ ps und $\sigma_{TCSPC} \approx 12$ ps liegt also mit 52 ps sogar über den gemessenen 49 ps. Die in Abb. A.1.12 dokumentierte Wellenlängenabhängigkeit von σ_{APD} verursacht die Abweichung; Streuung bei 480 nm führt bspw. zu einem 56 ps breiten dominanten Beitrag.

Der langsame Teil der IRF kann zwei Ursachen haben:[117] zum einen eine die APD-Totzeit unterschreitende Messelektroniktotzeit¹⁰, zum anderen kann es sich um den für APDs typischen „diffusion tail“ [118, Kap. 4.6] handeln.

⁹Letztlich zur vierten Potenz, da die Beiträge zur IRF selbst quadratisch gewichtet werden.[112]

¹⁰Laut den technischen Daten der *PicoHarp* theoretisch möglich, falls die tatsächliche Totzeit 20 % unter der maximalen liegt.

3.4.4. Auswertung der Korrelationskurven

Mit der Kenntnis von $g(t)$ und $\text{IRF}(t)$ lässt sich $I(t)$ per Fouriertransformation \mathcal{F} direkt berechnen:

$$I(t) = \mathcal{F}^{-1} \frac{(\mathcal{F}g)(\nu)}{(\mathcal{F}\text{IRF})(\nu)}. \quad (3.3)$$

(3.3) gilt jedoch nur für rauschfreie Signale; reale Signale müssen mit numerischen Näherungsmethoden entfaltet werden.[119] Dazu wird eine synthetische Kurve g^{syn} berechnet und deren Parameter iterativ verändert, bis synthetische und gemessene Kurve möglichst genau übereinstimmen. Die Qualität der Anpassung wird mit χ_{red}^2 überprüft, der mit der Gesamtzahl aller Zählereignisse normierten Summe über $(g(t) - g^{\text{syn}}(t))^2$, wobei die Summe über alle Messpunkte in t läuft. χ_{red}^2 soll minimiert werden, kann aber nie den Wert 0 annehmen, da das Rauschsignal nicht nachgebildet wird.

Vorzugsweise werden die gemessenen Intensitätsverläufe $I_{vv}(t)$ und $I_{vh}(t)$ aus (2.10) direkt analysiert.[14, Kap. 11] Ist die IRF nicht polarisationsabhängig, ist dies auch mit $D(t)$ und $S(t)$ möglich.[20] Die verwendete Anpassungssoftware *FluoFit 4.6.6* von *PicoQuant* nutzt die erste Methode.

Zunächst wird aus den drei unter Magic Angle gemessenen Kurven per globaler Anpassung die Fluoreszenzlebensdauer τ_f bestimmt. Die drei Kurven wurden jeweils mit 1PE (I_{ma}^1), linearer 2PE (I_{ma}^l) und zirkularer 2PE (I_{ma}^c) gemessen. Für die Anpassung der Anisotropiekurven kann τ_f dann ebenso wie $r_0^l = 1/7$ fixiert werden. Insgesamt wurden sechs dieser Kurven aufgenommen, I_j^k mit $j \in \{vv, vh\}$ und $k \in \{1, l, c\}$, um die Anisotropieparameter aus (2.40) zu erhalten. Mit der Fluoreszenzamplitude, zwei Rotationsdiffusionskomponenten mit Korrelationszeit und Amplitude, Hintergrundzählraten und zeitlichen Verschiebungen gibt es zehn freie Parameter pro Anisotropiezerfallspaar. Dadurch wird die Aufnahme von 1PE Anisotropiespektren gerechtfertigt: Sie liefert keinen Beitrag zur Bestimmung des Übergangstensors, verbessert aber die Datenlage zur Rotationsdiffusion und somit die statistische Sicherheit der Rotationskorrelationszeiten. Zudem können Anpassungen mit $\sum r_i^1 > 0,4$ als physikalisch unmöglich verworfen werden.

Das Gleichungssystem (2.40) wird in *Maplesoft Maple 18.02* gelöst. Der maximale Drehwinkel α_z ist dabei ein freier Parameter, da er experimentell nicht bestimmt werden konnte; siehe Abschnitt 4.1.1. Die Darstellung des Lösungsraumes sowie die punktweise Berechnung von $\Omega_{TP} = \frac{I_{ma}^c(t)}{I_{ma}^l(t)}$ erfolgt mit *Origin 9.2G*.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. UV-VIS- und Fluoreszenzspektroskopie

Die spektralen Daten aller Farbstoffe sind in Kapitel A.2 dokumentiert. Der Bandpass *HQ 590-70* ist für alle Farbstoffe außer Perylen die beste verfügbare Wahl. Zudem stellt die Absorption von Squalen, die erst bei Wellenlängen kleiner als 450 nm relevant wird, kein Problem für die Aufnahme zeitaufgelöster Fluoreszenz dar (vgl. Abb. A.2.18 und Abb. A.2.15).

4.1.1. Stationäre Tieftemperaturanisotropiespektroskopie

Zur Bestimmung der fundamentalen Anisotropie r_f müssen Tieftemperaturanisotropiespektren aufgenommen werden. Als Funktionstest wird versucht, die bereits in [78] veröffentlichten Resultate von Perylen in PDO zu reproduzieren. Der Test verlief erfolglos, wie in Abb. A.3.1 bis Abb. A.3.3 dokumentiert ist. Zum einen ist die im Kryostaten gemessene Anisotropie bei Raumtemperatur aus ungeklärten Gründen ca. $1/3$ niedriger als die außerhalb gemessene. Zum anderen wird die veröffentlichte fundamentale Anisotropie von $r_f = 0,369$ um mehr als $1/3$ unterschritten und ist überdies wellenlängenabhängig.

Um auszuschließen, dass sich die Probleme nur auf das System Perylen-PDO beschränken, wird Rhodamin 6G in Glycerin untersucht (Abb. A.3.4 bis Abb. A.3.6). Nun liegt bei Raumtemperatur die Anisotropie innerhalb des Kryostaten um ca. 25 % höher als außerhalb. Die fundamentale Anisotropie ist sogar niedriger als die bei Raumtemperatur gemessene. Weitere Probleme zeigen sich bei der Aufnahme von Anisotropiespektren von Terrylen in verschiedenen Lösungsmitteln. Getestet wurden Toluol, 1-Octanol, Squalen und Nonan. Trotz der Lösemittelunabhängigkeit der fundamentalen Anisotropie ist Nonan besonders interessant, da es als Shpol'skii Matrix für Terrylen[120] dieses kleinräumig umschließt.

Toluol kristallisiert monoklin bzw. unterhalb von 105 K orthorhombisch,[121] Octanol monoklin[122] und Nonan als Alkan ungerader Länge orthorhombisch[123]. Kristallisiert ein Lösemittel bei Abkühlung in einer solchen anisotropen Kristallstruktur, so wird es doppelbrechend und eine Aufnahme von Anisotropiespektren unmöglich. Squalen besitzt eine Glasübergangstemperatur von 178 K[124], die Experimente legen jedoch nahe, dass die

Kühlgeschwindigkeit von ca. 200 K/h nicht für den Glasübergang ausreicht. Exemplarisch dafür sind die Ergebnisse für Squalen im Anhang gegeben (Abb. A.3.8 und Abb. A.3.7).

Weiterhin unklar bleibt die Abweichung der Messungen in PDO und Glycerin von veröffentlichten Resultaten, da sowohl das Fluoreszenzspektrometer mit den Polarisatoren als auch der Kryostat mit Fenstern aus Quarzglas (*Suprasil B*) für die Anisotropiespektroskopie geeignet sind. Problematisch können unter mechanischen Spannungen stehende Fenster sein. Aufgrund fehlender Angaben in [78] kann eine zu niedrige Kühlgeschwindigkeit ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Wiederholungsexperimente sollten von der im Handbuch des Kryostaten vorgeschlagenen Methode, die Probe zusammen mit der Kammer abzukühlen, absehen. Die Probe sollte für eine möglichst große Kühlgeschwindigkeit direkt in die vorgekühlte Kammer eingesetzt werden. Zudem sollte Squalen wie in [124] über 80° C heißem Kieselgel gesäult oder mit einer vergleichbaren Methode aufgereinigt werden, um potentielle Kondensationskeime zu entfernen.

4.2. Zeitaufgelöste Doppelresonanzspektroskopie

4.2.1. Pikosekunden-Pump-Probe: Einschätzung der Fluoreszenzlöschung

Mit diesem Aufbau soll die Fluoreszenz von Farbstoffen (lokal) gelöscht werden. Ob dies mit einem bestimmten Farbstoff möglich ist, wird auf molekularer Ebene durch seine Wirkungsquerschnitte σ für die verwendeten Wellenlängen beschrieben.[125] Daraus folgt, dass nicht alle Farbstoffe gleichermaßen mit Doppelresonanzmethoden untersucht werden können. Darüber hinaus ist die Bewertung abhängig von den zugänglichen Wellenlängen und Intensitäten. Dementsprechend muss ein Faktor, der die Eignung umfassend beschreiben soll, auch apparative Parameter einschließen.

Die Identifikation geeigneter Farbstoffe ist ein wichtiger Betrag zur Verbesserung der

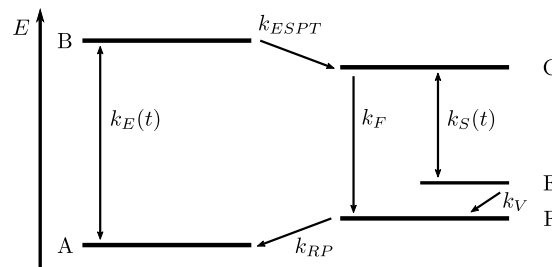


Abbildung 4.1.: Vereinfachtes Termschema einer Photosäure im Pump-Probe-Experiment.

STED-Mikroskopie, weil diese wie Pump-Dump-Spektroskopie auf Fluoreszenzlöschung basiert.[4] Darum heißt der Faktor, mit dem sich die Fluoreszenz von Farbstoffen durch einen zweiten Puls löschen lässt, STED-Effizienz.[46] Unter bestimmten Voraussetzungen ist sie analytisch lösbar,[51] im Allgemeinen kann sie durch die numerische Lösung eines Differentialgleichungssystems (DGLS) gefunden werden. Teil der Lösung ist der zeitliche Verlauf der Besetzung des fluoreszierenden Zustandes $N_{Fl}(t)$, aus dem die STED-Effizienz η hervorgeht:

$$\eta = 1 - \frac{\int_0^\infty k_F N_{Fl}(t) dt \Big|_{Dump}}{\int_0^\infty k_F N_{Fl}(t) dt}. \quad (4.1)$$

k_F ist die Fluoreszenzratenkonstante. Für den Dividenten gilt, dass zum Zeitpunkt t_S ein Dumpimpuls eingestrahlt wird; der Divisor beschreibt die maximale Fluoreszenz.

Das eigentliche Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der lokalen Reaktionsgeschwindigkeit des ESPT. Aus diesem Grund wird das DGLS für die DRS einer vereinfachten Photosäure aufgestellt. Das zugehörige Termdiagramm ist in Abb. 4.1 dargestellt. Grund- und erster angeregter Zustand der Photosäure werden vom Anregungslaser mit $k_E(t)$ gekoppelt. Sie deprotoniert mit k_{ESPT} und reprotoniert mit k_{RP} . Die Photobase fluoresziert mit k_F und der Dumplaser koppelt mit $k_S(t)$ den ersten angeregten Zustand der Base mit einem schwingungsangeregten Zustand des Grundzustandes. Letzterer relaxiert mit k_V . Die einzelnen Laserpulse $k_E(t)$ und $k_S(t)$ erreichen ihr Maximum zu den Zeiten t_i mit den zeitabhängigen Profilen

$$k_i(t) = \frac{p_i}{a_i \sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{(t-t_i)^2}{a_i^2}\right) \quad (4.2)$$

$$a_i = \frac{\tau_i}{2\sqrt{\ln 2}}, \quad p_i = \left(\frac{W}{A}\right)_i \frac{\lambda_i}{hc} \sigma_i.$$

Daraus ergibt sich das Differentialgleichungssystem

$$\begin{aligned} \frac{dA}{dt} &= k_E(t)(B(t) - A(t)) + k_{RP}F(t) \\ \frac{dB}{dt} &= k_E(t)(A(t) - B(t)) - k_{ESPT}B(t) \\ \frac{dC}{dt} &= k_S(t)(E(t) - C(t)) + k_{ESPT}B(t) - k_FC(t) \\ \frac{dE}{dt} &= k_S(t)(C(t) - E(t)) - k_VE(t) \\ \frac{dF}{dt} &= k_VE(t) + k_FC(t) - k_{RP}F(t). \end{aligned} \quad (4.3)$$

4. Ergebnisse und Diskussion

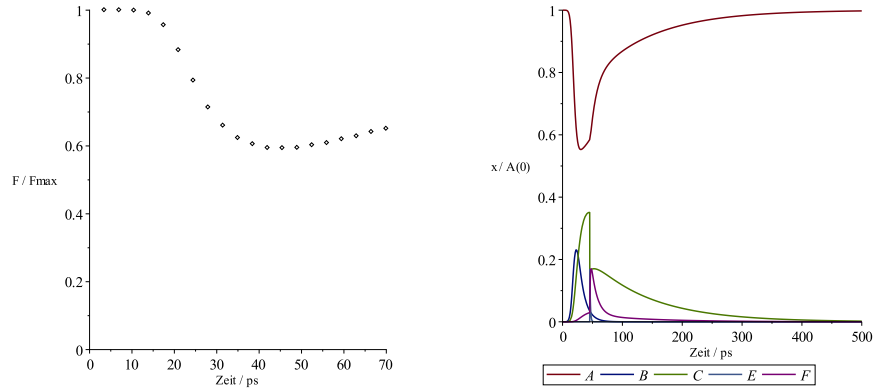


Abbildung 4.2.: Fluoreszenzreduktion für pumpen mit der 405 nm-Diode und dumpen mit dem TVIS bei 630 nm.

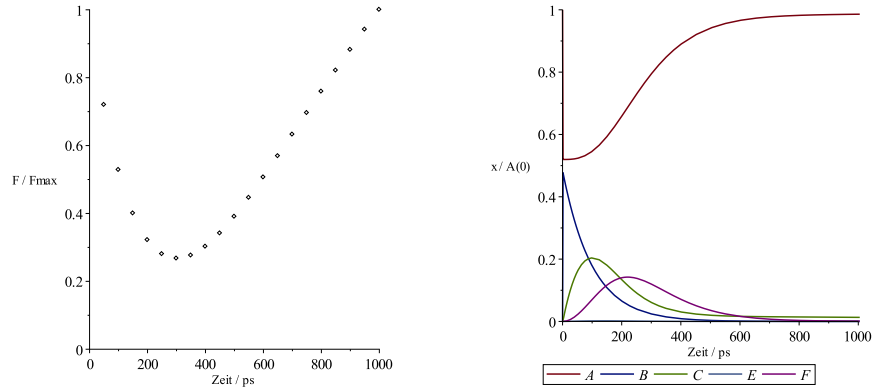


Abbildung 4.3.: Fluoreszenzreduktion für pumpen mit dem TVIS bei 532 nm und dumpen mit der 635 nm-Diode.

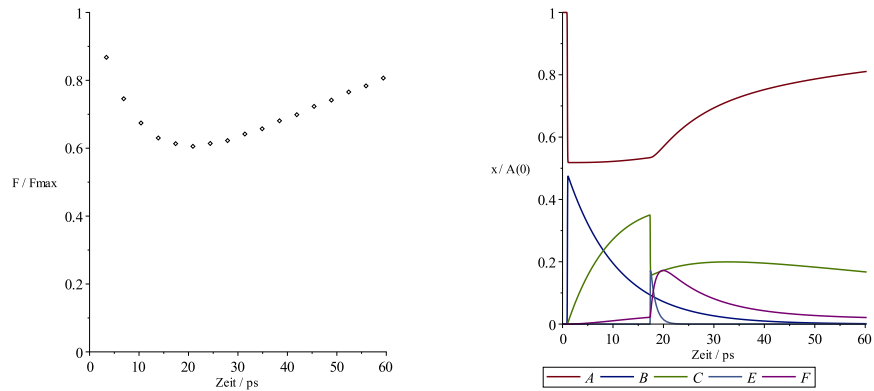


Abbildung 4.4.: Fluoreszenzreduktion für pumpen mit dem TVIS bei 532 nm und dumpen mit dem NIR bei 780 nm.

Aus den Lösungen von (4.3) zu unterschiedlichen t_S lässt sich die optimale Verzögerung des Dumpimpulses gegen den Pumpimpuls ablesen. Die linken Graphen der Abbildungen 4.2 bis 4.4 zeigen die Funktion $\eta(t_S)$ für drei Kombinationen von Pump- und Dumpplaser. Die rechten Graphen enthalten die Besetzungsverläufe in der Photosäure bei minimalem η . Je geringer die Besetzung von $C = N_{Fl}$ ist, desto geringer ist die Fluoreszenz.

Tab. A.1 dokumentiert die für die Simulationen verwendeten Parameter. Zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der vorhandenen Laser, muss der Einfluss eines ungeeigneten Farbstoffspektrums ausgeschlossen werden. Deswegen wurde σ für alle Wellenlängen mit demselben hohen Wert von 10^{-16} 1/cm^2 angesetzt. Die mitunter sehr hohen Ratenkonstanten von $k_{ESPT} = 0,1 \text{ 1/ps}$ und $k_F = 10 \text{ 1/ns}$ sind Zugeständnisse an die begrenzten Ressourcen des verwendeten PC. Mit langsameren Reaktionen muss der Bereich Δt_{sim} , in dem die numerische Lösung jeweils berechnet wird, vergrößert werden. Das für die Simulationen verwendete *Maple 18.02* quittiert dies mit einem zu hohen Speicherbedarf. Für die Aussagen zur Eignung stellt dies kein Problem dar, es verschiebt sich im Wesentlichen der optimale Zeitpunkt für den Dumpimpuls. Dasselbe Argument greift bei der Verringerung der Pulsbreite der 405 nm-Diode auf 10 ps. Die angesetzten mittleren Leistungen $\langle P \rangle$ sind mit den Lasern jeweils problemlos zu erreichen.

Die Ergebnisse belegen wie zu erwarten, dass nicht die Leistung entscheidend für die Fluoreszenzreduktion ist, sondern die Pulsbreite.[126] Kurze Dumpimpulse mit hohen Spitzenintensitäten erzeugen im Moment der Wechselwirkung mit dem Farbstoff durch Anregung und stimulierte Emission eine Gleichbesetzung von C und E . Dadurch dass C vor dem Dump fluoresziert und durch den ESPT danach wieder besetzt wird, verringert sich die maximale STED-Effizienz sogar auf $\eta \approx 0,4$. Durch den 400 ps breiten Dumpimpuls der 635 nm-Diode kann E schwingungsrelaxieren, und darüber hinaus die Besetzung während des gesamten ESPT von C nach F transferiert werden, sodass sich die STED-Effizienz bei gleicher Leistung auf $\eta \approx 0,75$ fast verdoppelt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit kosteneffizienten STED-Lösungen mit mittleren Leistungen von 1 mW.[127]

Die real gemessene Fluoreszenzlöschung hängt darüber hinaus vom Überlapp der Intensitätsverteilungen beider Laserstrahlen in der Probe ab. Eine schlechte spektrale Trennung von Säure- und Baseform einer Photosäure erhöht η , wenn dadurch neben der Basenform auch die Säureform im beobachteten Spektrum fluoresziert. Insgesamt ist dennoch zu erwarten, dass mit dem vorhandenen Aufbau Pump-Dump-Spektroskopie an spektral geeigneten Farbstoffen betrieben werden kann. Die Aussicht auf erfolgreiche Messungen ist mit der 635 nm-Diode am besten.

4.2.2. Pikosekunden-Pump-Probe: Experimentelle Resultate

Photosäuren

Viele im AK Jung synthetisierte pyrenbasierte Photosäuren haben ähnliche Absorptions- und Emissionsspektren.[56, 91, 92] Als Beispiel wird hier kommerziell erhältliches HPTA in DMSO diskutiert. Abb. A.2.6 zeigt, dass die Säureform mit 405 nm und die Basenform mit 532 nm anregbar ist. Die Fluoreszenz kann mit dem HQ 590-70 Bandpass gesammelt werden. Das Emissionsspektrum der Base verschwindet bei 635 nm nicht, sodass die LDH-P-C-635B die Besetzung aus $S_{1,\nu=0}^{\text{RO}^-}$ nach $S_{0,\nu=1}^{\text{RO}^-}$ verschieben sollte.

Die Aufnahme eines Pump-Dump-Spektrums gelang jedoch mit keiner der Laserkombinationen aus Tab. 3.2. Der NIR führte sogar zu einer Zunahme der Fluoreszenz, da HPTA bei effektiven 390 nm 2PE zeigt, vgl. Abb. 4.5. Weder die direkte Anregung der Photobase noch die Anregung der Photosäure führte zu messbarer Fluoreszenzlöschung einer Photosäure nach ESPT.

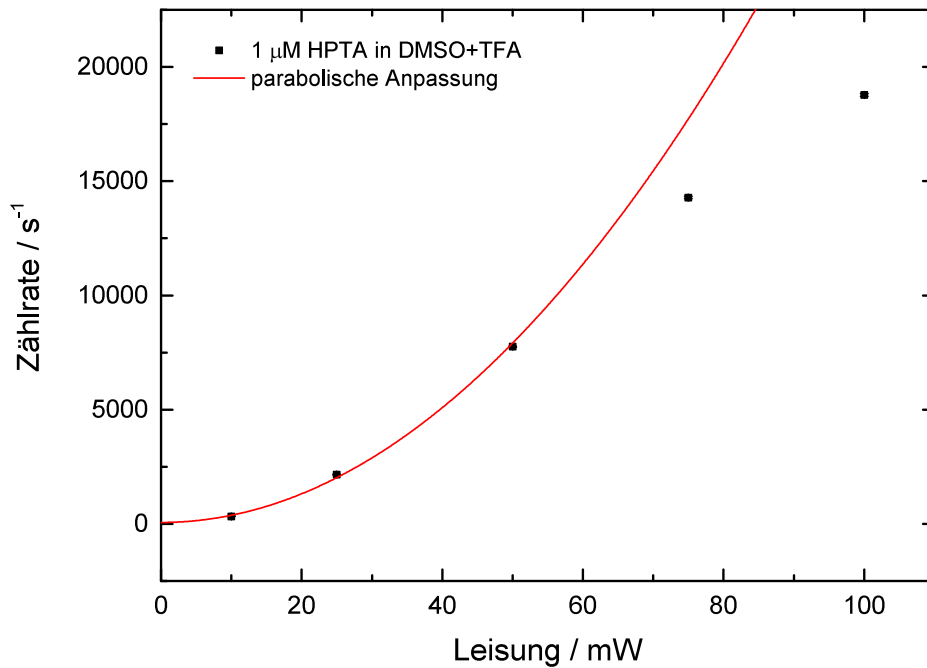


Abbildung 4.5.: HPTA zeigt 2PE durch Anregung bei 780 nm.

Ursache dafür kann ein zu geringer Wirkungsquerschnitt $\sigma(635 \text{ nm})$ der Photosäuren sein. Mit dem TVIS ist ein Laser vorhanden, der auf 610 nm eingestellt werden kann, und dort

wesentlich besser über dem $S_{1,\nu=0}^{\text{RO-}}-S_{0,\nu=1}^{\text{RO-}}$ -Übergang liegt, als die LDH-P-C-635B. Dass auch 100 fs-Pulse mit einer mittleren Leistung von 2 mW in der Lage sind, Fluoreszenz zu löschen, zeigt das folgende Beispiel der NV-Zentren. In Ermangelung eines geeigneten Strahlteilers konnte diese These jedoch nicht überprüft werden.

NV-Zentren in Diamant

Für den AK Becher wurde eine Probe nanokristalliner Diamanten auf Silizium auf Zweiphotonenanregbarkeit untersucht. Die Siliziumprobe war dünn und durchscheinend, weshalb jedes Signal mit der zur reversiblen Befestigung genutzten Wärmeleitpaste „Arctic Silver 5“ verglichen werden muss. Die TCSPC-Kurven in Abb. A.4.1 wurden mit dem NIR bei 780 nm und 100 mW aufgenommen. Beide Materialien sind nicht mit 780 nm anregbar.

Die Probe findet hier Erwähnung, da bekannt ist, dass sich NV-Zentren zur Untersuchung mit STED-Mikroskopie eignen.[128] Mit dieser Probe kann die Funktion des vorliegenden Aufbaus gezeigt werden.

Abb. 4.6 zeigt die Zählratenveränderung, wenn die Probe zusätzlich zur Anregung bei 532 nm mit einem 780 nm-Laser bestrahlt wird. Die Fluoreszenz wird in der Tat vermindert.

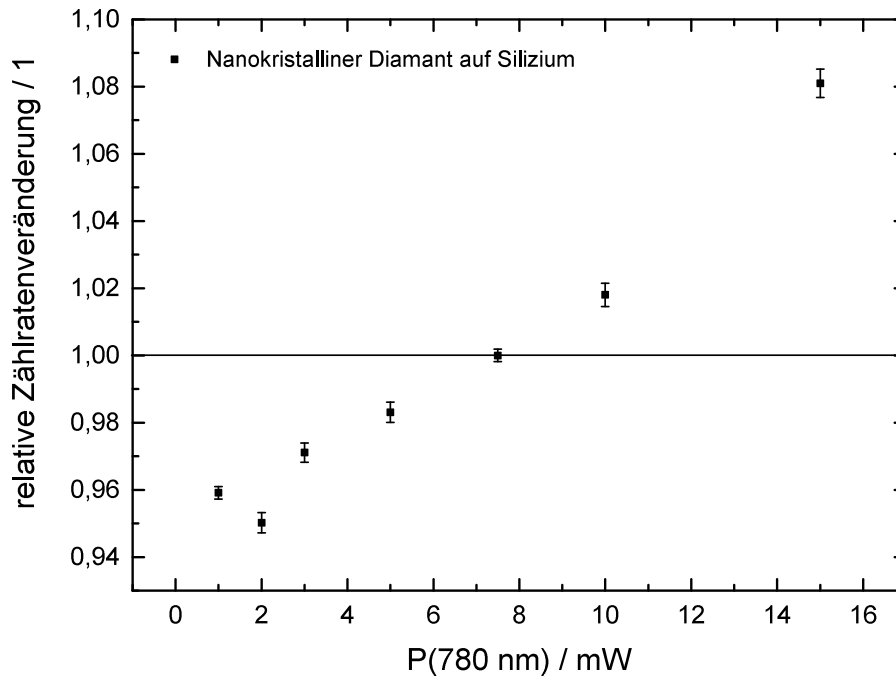


Abbildung 4.6.: Mit zunehmender Leistung übersteigt die Streuung die Fluoreszenzlöschung.

Die hohe Streuung an der Probenoberfläche verursacht die Zunahme der Zählrate überhalb von 2 mW. Dieses Problem ließe sich nur lösen, wenn die Detektion von Photonen für die Dauer des Dumpspulses unterbunden würde.[129] Die Gate-Eingänge der vorhandenen APDs sind – abgesehen von der schaltstrombedingten Unbenutzbarkeit – mit Umschaltzeiten von $t_r \approx 100$ ns für diese Anwendung zu träge. Es wäre dagegen möglich, die Detektionsschleife auf dem FPGA mit den Laserpuls zu synchronisieren. Die Schleife läuft mit 200 MHz, sodass die Signale in einem zur Verzögerung passenden 5 ns-Intervall verworfen werden könnten.

Merocyanin 540

Abb. A.4.2 zeigt die Reaktion von MC540 auf die gleichzeitige ($\Delta t_{puls} = 20$ ps) Anregung mit $\langle P(532 \text{ nm}) \rangle = 300 \mu\text{W}$ und variabler $\langle P(780 \text{ nm}) \rangle$. Die Daten stammen von derselben Probe, die zunächst O_2 -frei, dann gesättigt vermessen wurde. Ab 5 mW ist das RISC so ausgeprägt, dass der T_1 ebenso effektiv wie durch die Anwesenheit von Sauerstoff geleert wird. Bei noch höherer Probeleistung reduziert sich die Fluoreszenz in beiden Fällen um denselben Faktor auf 60 %. Dieses Verhalten ist demnach unabhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff im Reaktionsraum.

Das zweite Phänomen wurde bei der niedrigeren Pumpleistung $\langle P(532 \text{ nm}) \rangle = 50 \mu\text{W}$

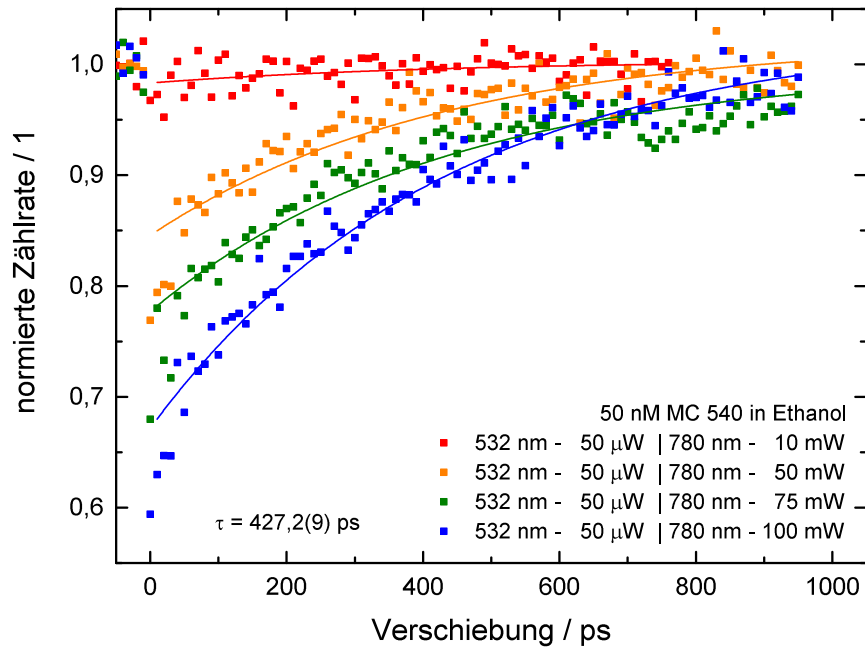


Abbildung 4.7.: Globale Anpassung der vier Pump-Probe-Spektren von MC540 in Ethanol. Die Lebensdauer $\tau = 427$ ps liegt im erwarteten Bereich.[41]

zeitaufgelöst untersucht. Für diese niedrige mittlere Anregungsleistung kann die Besetzung des Triplettzustandes vernachlässigt werden.[47] Abb. 4.7 enthält die Pump-Dump-Spektren einer sauerstoffgesättigten Probe MC540 in Ethanol. So ist zweifach sichergestellt, dass auch bei hohen Dumpleistungen kein RISC auftritt. Dessen Dynamik soll im Mikrosekundenmodus gesondert untersucht werden. Die Kurven wurden auf ihre mittlere Zählrate im Bereich von $t \in [-200, 0]$ normiert. Eine monoexponentielle globale Anpassung der Kurven gemäß

$$F^i(t) = F_{max}^i - F_{min}^i \exp(t/\tau) \quad (4.4)$$

mit global gültiger Lebensdauer $\tau = 427$ ps führt zu den in Tab. 4.1 dokumentierten Werten für die Fluoreszenzreduktion

$$\eta_{exp} = 1 - \frac{F_{min}}{F_{max}}. \quad (4.5)$$

Die Auftragung von η gegen die Dumpleistung in Abb. 4.8 zeigt den linearen Zusammenhang beider Größen. Die Anpassung mit einer Ursprungsgeraden liefert eine Steigung von $m = 3,1(1) \text{ } 1/\mu\text{W}$. Um dieses Verhalten zu erklären, wird das Pump-Dump-Experiment numerisch simuliert.

Analog zu (4.2), gilt für die Anregung mit 532 nm ($k_e(t)$) bzw 780 nm ($k_s(t)$)

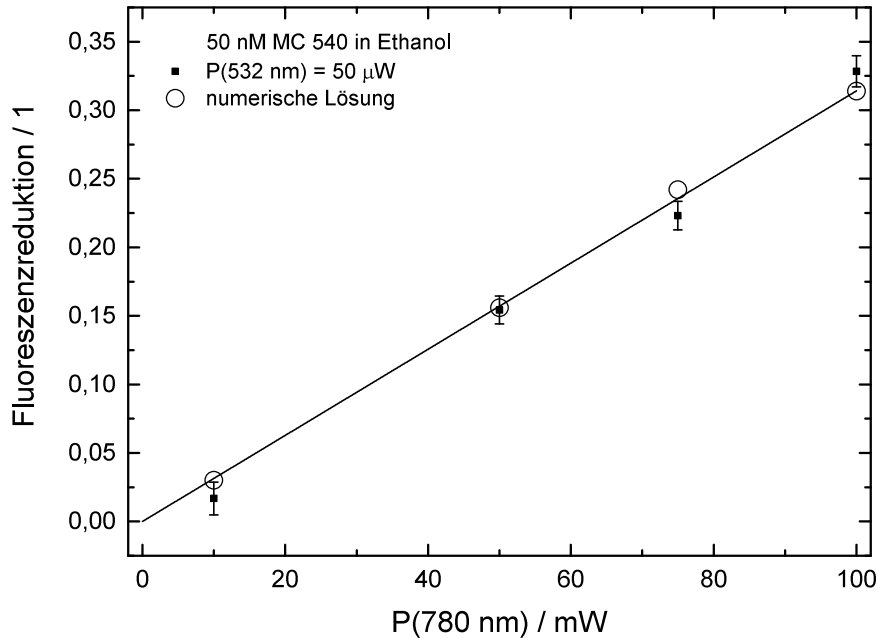


Abbildung 4.8.: Die Fluoreszenzreduktion von MC540 in Ethanol aus Messdaten, linearer Anpassung und numerischer Lösung.

$$k_i(t) = \frac{p_i}{a_i \sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{(t-t_i)^2}{a_i^2}\right) \quad (4.6)$$

$$a_i = \frac{\tau_i}{2\sqrt{\ln 2}} \quad , \quad p_i = \left(\frac{W}{A}\right)_i \frac{\lambda_i}{hc} \sigma_i.$$

MC540 weist um 400 nm transiente Absorption auf.[130] Wenn die Auswahlregeln es erlauben, kann der S_1 durch 2PE mit der effektiven Wellenlänge $\lambda_{eff} = 390$ nm angeregt werden. Das begründet eine weitere Anregungsrate $k_{void}(t)$ bei 780 nm,

$$k_{void}(t) = \frac{1}{2} \sigma_{2PE}^{S_1} (I_S(t))^2. \quad (4.7)$$

$I_S(t) = k_S(t)/\sigma_S$ ergibt sich aus (4.6); $\sigma_{2PE}^{S_1}$ ist der relative Zweiphotonenwirkungsquerschnitt für Merocyanin bei 780 nm. Es wird angenommen, dass nach der 2PE keine Fluoreszenz mehr stattfindet, d.h. das hochangeregte Molekül zerfällt nach der Anregung oder wird durch interne Konversion abgeregt. Eine weitere Annahme ist, dass aufgrund der langsamen Rückisomerisierungsdynamik[47] das cis-Isomer nicht signifikant zur Fluoreszenz beiträgt. Die Betrachtung beschränkt sich damit auf den trans-Singulettzweig mit dem zugehörigen Differentialgleichungssystem

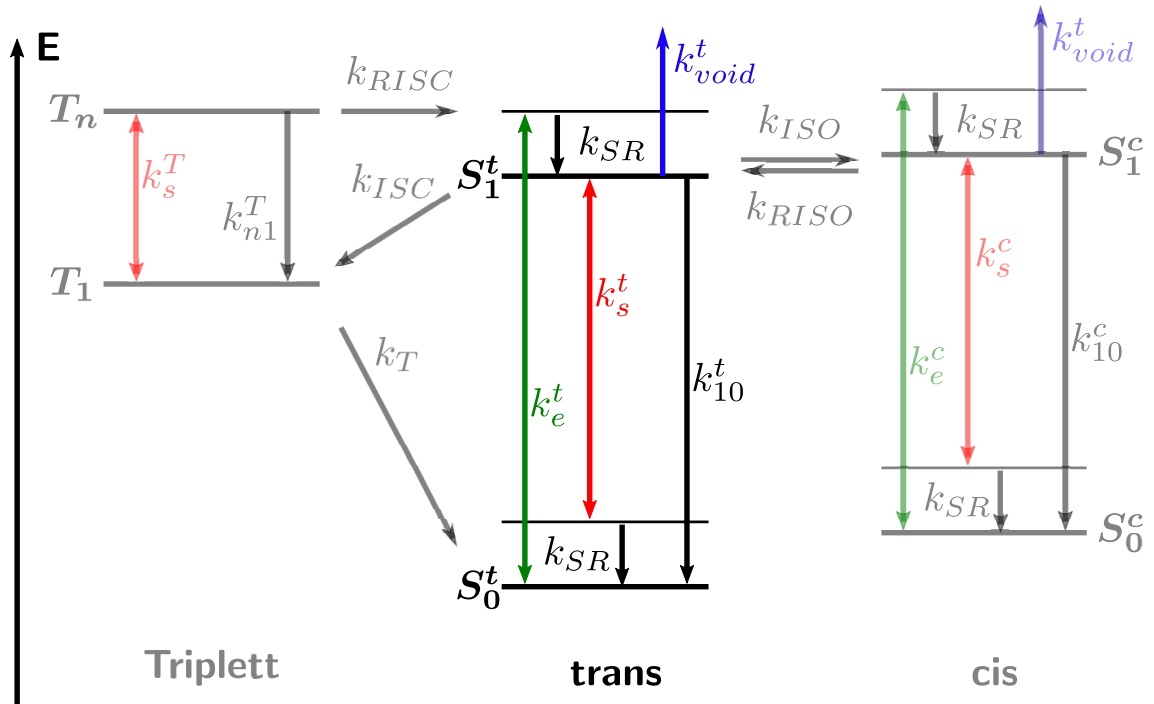


Abbildung 4.9.: Modifiziertes Termschema für MC540 unter Anregung mit 532 nm und 780 nm.

Tabelle 4.1.: Vergleich der experimentellen, angepassten und simulierten Fluoreszenzreduktion von MC540 in Ethanol.

$\langle P(780 \text{ nm}) \rangle /$ mW	η_{exp}	η_{fit}	η_{sim}
10	0,02(1)	0,031(1)	0,03
50	0,15(1)	0,155(5)	0,156
75	0,22(1)	0,233(8)	0,224
100	0,33(1)	0,31(1)	0,314

$$\begin{aligned}
 d_t A &= k_e^t(t)(B(t) - A(t)) + k_{SR}E(t) + k_{10}^t C(t) \\
 d_t B &= k_e^t(t)(A(t) - B(t)) - k_{SR}B(t) \\
 d_t C &= k_s^t(t)(E(t) - C(t)) + k_{SR}B(t) - k_{10}^t C(t) - k_{void}(t)C(t) \\
 d_t E &= k_s^t(t)(C(t) - E(t)) - k_{SR}E(t).
 \end{aligned} \tag{4.8}$$

(4.8) wurde mit einer Prozedur in *Maple 18.02* numerisch für verschiedene Anregungsleistungen $\langle P(780 \text{ nm}) \rangle$ gelöst. Die maximale Fluoreszenzreduktion ergibt sich im Modell (4.8) für die Verzögerung $t_s^{opt} = 18 \text{ ps}$. Dies ist mit Abb. 4.7 vereinbar, denn die Fluoreszenzlöschung ist in der Tat bei einer Verschiebung zwischen 0 ps und 20 ps maximal. Die simulierte Fluoreszenzreduktion η_{sim} ergibt den in Abb. 4.8 dargestellten Verlauf für

$$\sigma_s = 3,5 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^2 \quad \wedge \quad \sigma_{2PE}^{S_1} = 5,5 \cdot 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s}, \tag{4.9}$$

der gut mit dem tatsächlichen Verlauf der Fluoreszenzreduktion übereinstimmt. Die η_{sim} wurden gemäß (4.1) bestimmt und sind in Tab. 4.1 dokumentiert. Der niedrige Wert für σ_s ist plausibel, da die Dumpmpulse bei 780 nm weit vom Emissionsspektrum von MC540 entfernt sind, vgl. Abb. A.2.2. Der Zweiphotonenwirkungsquerschnitt $\sigma_{2PE}^{S_1}$ von ca. fünf Göppert-Mayer liegt in einem für viele Farbstoffe typischen Bereich.[44] Die vollständigen Parameter der numerischen Simulation sind im Anhang in Tab. A.4 zu finden.

Die gemessenen Werte lassen sich also durch die Anpassung zweier Parameter im trans-Singulettmodell für MC540 beschreiben. Dabei wurde die Fluoreszenzveränderung eines einzelnen Pulses untersucht, und implizit angenommen, dass ein Gleichgewicht zwischen den cis-trans-Isomeren vorliegt. Wegen der Diffusion durch das Anregungsvolumen und der gepulsten Anregung sollte überprüft werden, ob das System ein solches dynamisches Gleichgewicht erreicht, oder ob die Verzögerung t_s einen Einfluss auf den mittleren Anteil des cis-Isomers hat. Die entwickelte Prozedur muss dafür um den cis-Singulettzweig erweitert, und einzelpulsweise rekursiv mit den im letzten Durchgang erhaltenen Besetzungen

aufgerufen werden.

Wenn die Gültigkeit von (4.9) bestätigt wird, so kann durch eine entsprechende Charakterisierung[44] des Instruments aus $\sigma_{2PE}^{S_1}$ der absolute Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt für den S_1 von MC540 gewonnen werden.

4.2.3. Mikrosekunden-Pump-Probe: Optimale RISC-Detektion

Wie bei zeitkorreliertem Einzelphotonenzählen entsteht durch die Verschiebung des Abfragepulses im MSPP ein Histogramm aus Photonenanzahl gegen Verzögerungszeit. Mit geeigneter Korrelationshardware sind im Einzelphotonenzählen Detektionsraten von 10^7 1/s möglich. Im MSPP liegt die Zykluszeit über $10\text{ }\mu\text{s}$ und die Detektionsrate dementsprechend bei weniger als 10^4 1/s. Zur Vermeidung unnötig langer Messzeiten ist eine Optimierung der experimentellen Parameter hier besonders effektiv. Diese Parameter sind jeweils die mittlere Leistung der Laser, P_{532} und P_{635} sowie die Länge ihrer aktiven Phase, t_{532} und $t_{635} > 20\text{ }\mu\text{s}$. Die Einschränkung von t_{635} ist programmbedingt, vgl. Abschnitt 3.3.9. Zur Optimierung der Leistung wird der AOM dauerhaft aktiviert, sodass beide Laser kontinuierlich die Probe beleuchten. Das intersystem crossing zum Triplettzustand T_1 hat

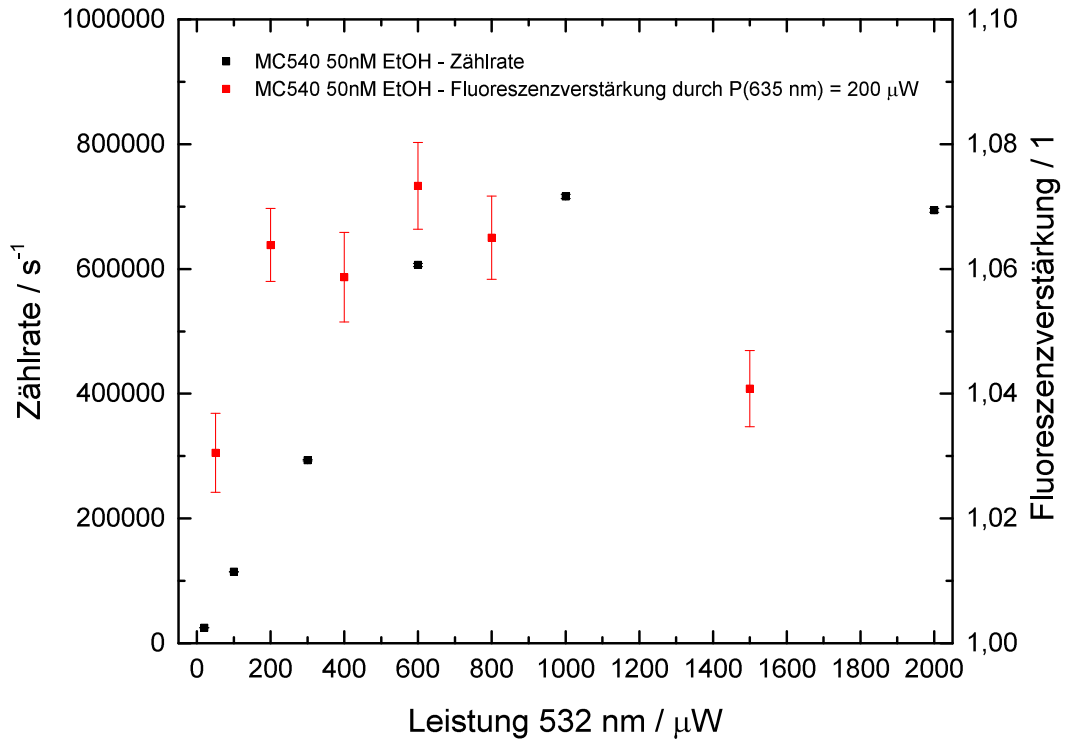


Abbildung 4.10.: Die absolute Zählrate sättigt, die Fluoreszenzverstärkung erreicht ihr Maximum bei $\langle P(532\text{ nm}) \rangle = 600\text{ }\mu\text{W}$.

eine lange Zeitkonstante im Bereich von 100 ns, die der Phosphoreszenz liegt jenseits einer Mikrosekunde.[131] Die Laserstrahlung kann somit als quasi-cw angenommen werden, die Zeitsynchronisation entfällt. Die Laserparameter müssen für jeden Farbstoff erneut überprüft werden; das Vorgehen wird an einer sauerstofffreien Lösung von MC540 in Ethanol gezeigt.

Abb. 4.10 ist zu entnehmen, dass die Zählrate einer 50 nM sauerstofffreien MC540-Lösung bei Anregung durch den TVIS mit 532 nm bei 1 mW sättigt. Die sekundäre Fluoreszenz nach RISC durch Anregung mit der 635 nm-Diode erreicht ihr Maximum sogar bei $P_{532} = 600 \mu\text{W}$. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Moleküle in nicht mehr zu vernachlässigendem Ausmaß an Photobleichen aus dem Triplettzweig leiden.[65]

Die Fluoreszenzverstärkung durch 635 nm nimmt dagegen monoton mit der Leistung zu. Abb. 4.11 zeigt, dass der vorhandene Laser das RISC nicht vollständig sättigt, weshalb die Leistung $P_{635} = 3000 \mu\text{W}$ auf die maximale Ausgangsleistung festgelegt wird.

Für die Messungen zu Abb. 4.10 und Abb. 4.11 wurde der AOM umgangen, sodass die Pulszüge von TVIS und P-C-635B zugleich auf die Probe treffen. Die Zeitgleichheit bezieht sich nicht auf Koinzidenzen einzelner Pulse. Dies ist auch nicht notwendig, da eine relative Verschiebung der Pulszüge gegeneinander auf Grund der langen Triplettlebensdauer ($\mathcal{O}(\tau_T)/\mathcal{O}(\Delta t_{puls}) \approx 10^3$) keinen Effekt zeigt.

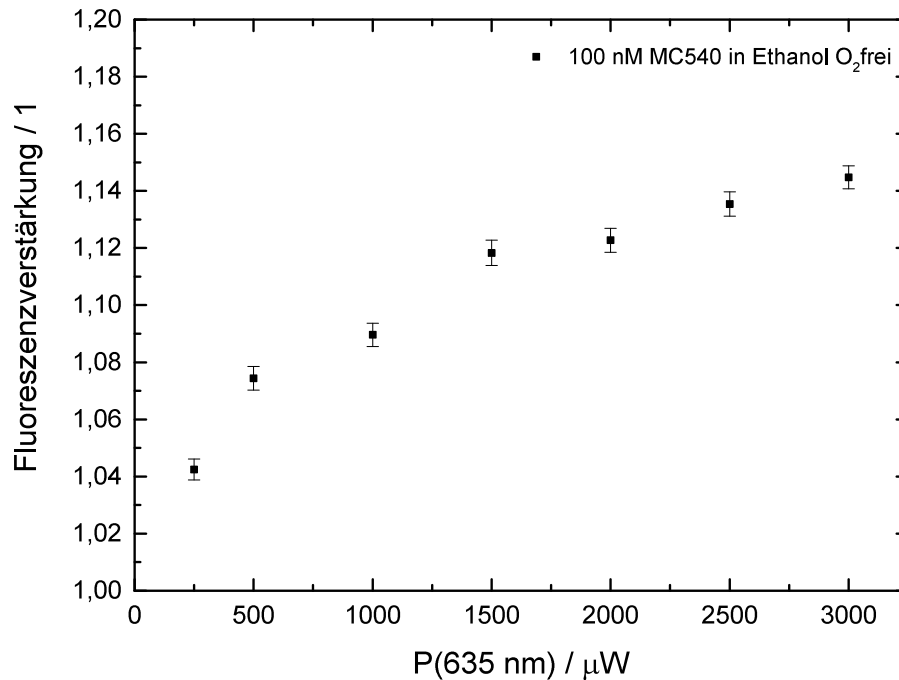


Abbildung 4.11.: Die Fluoreszenzverstärkung wird von der 635 nm-Diode möglicherweise nicht ausgereizt.

Die Laserdiode P-C-635B erzeugt eine nicht zu vernachlässigende Hintergrundzählrate. Sie ist in Abb. A.1.7 gegeben und unabhängig von der Konzentration an MC540. Abhängig von der eingestellten Ausgangsleistung ändert sich die Steigung der Zählrate. Ursache dafür ist, dass die Diode bei hoher Leistung breitere Pulse emittiert. Die spektrale Verteilung des emittierten Lichts wird schmaler und vom Strahlteiler *Chroma zt 532-640-NIR rpc* besser unterdrückt.¹¹

Bei den späteren Messungen muss die sekundäre Fluoreszenz mit diesem Hintergrund konkurrieren, weswegen die Detektionswahrscheinlichkeiten berechnet werden. Mit denselben Überlegungen können auch die aktiven Zeiten der Laser bestimmt werden.

Zunächst wird die Detektionseffizienz des konfokalen Aufbaus benötigt. Dessen instrumenteller Anteil ergibt sich aus dem Produkt der spektralen Sammeleffizienz der APD und der Transmissionen aller Filter sowie des Objektivs. Neben dem Bandpass *HQ 590-70* und dem Strahlteiler *zt 532-640-NIR rpc* wird der Filter *BG-39* verwendet, weil die Streulichtunterdrückung höher ist als die Signalunterdrückung. Die Transmissionsspektren werden mit UV-vis-Spektroskopie bestimmt. *Zeiss* gibt im relevanten Bereich zwischen 550 nm und 650 nm die Transmission mit $T_{obj} = 0,8$ an. Die Sammeleffizienz berechnet sich bei einem Wasserimmersionsobjektiv mit $NA = 1,2$ über den abgedeckten Raumwinkel zu $\Gamma_{rel} = 0,2844$. Zusammen mit der Emission von MC540 in Ethanol (vgl. Abb. A.2.1) folgt die spektrale Detektionswahrscheinlichkeit in Abb. A.1.8. Insgesamt bedeutet dies, dass lediglich $p_{inst} = 0,0136$ der emittierten Photonen detektiert werden.

Die durchschnittliche Anzahl an Molekülen, die an einem Pump-Probe-Zyklus teilnimmt, $\langle N_Z \rangle$ lässt sich ohne explizite Bestimmung des konfokalen Volumens V_{conf} aus Fluoreszenzkorrelation (FCS[132]) gewinnen. Die gewöhnlich verwendete Konzentration von 50 nM ist zu hoch für eine verwertbare FCS-Messung. Für die Korrelationsamplitude gilt $G_0 = 1/\langle N \rangle = 1/c \times V_{conf}$, und damit $\langle N \rangle \propto c$. [133] Aus der in Abb. A.1.9 dargestellten Messung mit sauerstoffgesättigter 5 nM Lösung von MC540 in Ethanol geht hervor, dass $\langle N_Z \rangle = 20$ ist.

Nicht alle Moleküle im konfokalen Volumen lassen sich in den T_1 bringen. Ein einzelner Anregungspuls mit P_{532} erzeugt Gleichbesetzung von S_0 und S_1 . Die Effizienz des ISC liegt zwischen $\Phi_{ISC} = 0,003$ [134] und $\Phi_{ISC} = 0,02$ [135]. Die Ratenkonstante des Besetzungszersfalls des T_1 in sauerstofffreier Umgebung wird zwischen $k_T = 2 \cdot 10^5 \text{ 1/s}$ [47] und $k_T = 1,25 \cdot 10^3 \text{ 1/s}$ [41] angegeben. In der ungünstigsten Kombination (geringe Übergangseffizienz und schneller Zerfall) ist nach n Anregungspulsen im Abstand $t_{Rep} = 12,5 \text{ ns}$ die Besetzungswahrscheinlichkeit des T_1 demnach

¹¹Das Spektrum der P-C-635B wurde mit dem Faserspektrometer *S2000* untersucht. Ein Bandpassfilter kann die kurzwelligen Anteile, welche die Kante des Strahlteilers passieren, entfernen.

$$p(T_1, n) = 1 - \prod_n (0,9985 + 0,0015(1 - \exp(-k_T t_{Rep} n))) \quad (4.10)$$

Gemäß Abb. A.1.10 sättigt diese Wahrscheinlichkeit mit $p(T_1) = 0,45$ nach $t_{532} = 30 \mu\text{s}$ und es befinden sich im Mittel $\langle N_Z \rangle p(T_1) = 9$ Moleküle pro Zyklus im T_1 . Bei Anregungsleistungen von $600 \mu\text{W}$ läuft die (Rück-)Isomerisierung in unter 50 ns ab.[47] Daher sollte die Isomerisierung nicht die Besetzung des T_1 , sondern nur mit den nicht im Dunkelzustand gefangenen Molekülen stattfinden.

Die Effizienz des RISC ist $\Phi_{RISC} = 0,77$. [77] Unter der Voraussetzung, dass k_{ISC} und k_{RISC} in derselben Größenordnung liegen, können die Abfragepulse mit 635 nm höchstens Gleichbesetzung zwischen T_1 und den angeregten Triplettzuständen erzeugen. Der T_1 ist damit nach ca. 24 Pulsen geleert ($(1 - 0,5 \times 0,77)^{24} < 10^{-5}$). Mit der Repetitionsrate von 80 MHz ergibt sich $t_{635}^{opt} = 300 \text{ ns} \ll 20 \mu\text{s} = t_{635}$. Die kurze Zeitspanne schließt eine Desaktivierung über k_T weitestgehend aus, weswegen mit der Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_F = 0,16$ [41] pro Zyklus eine mittlere Anzahl von $\langle N \rangle_{RISC} = \langle N_Z \rangle p(T_1) \Phi_F = 1,44$ sekundären Photonen erzeugt wird.

Die Wahrscheinlichkeit, in einem Pump-Probe-Zyklus ein sekundäres Photon zu detektieren beträgt $p_{det} = \langle N \rangle_{RISC} p_{inst} \approx 0,02$. Der Hintergrund in dem $20 \mu\text{s}$ -Fenster beträgt $p_{bck} = 2 \cdot 10^{-5} \times 400 = 0,008$ und die erwartete $\text{SNR} \approx 2,5$. Tabelle 4.2 fasst die Laserparameter, welche aus den Überlegungen folgen, zusammen.

Tabelle 4.2.: Für die Detektion sekundärer Fluoreszenz optimierte Laserparameter.

	P_{532}	P_{635}	t_{532}	t_{635}
MC540 in Ethanol	$600 \mu\text{W}$	$3000 \mu\text{W}$	$30 \mu\text{s}$	$20 \mu\text{s}$

Der letzte Optimierungsschritt ist es, die an der Probe vorliegende Pause zwischen Pumpen und Abfragen zu bestimmen. Um einen Überlapp der Anregungs- und Abfragezeiträume zu vermeiden und die korrekten Pausenlängen anzugeben, muss der Laufzeitunterschied der Laser abgeschätzt werden, vgl. Abschnitt 3.3.1. Die Gesamtlaufzeit der Pulse zur Probe setzt sich zusammen aus der Laufzeit der elektrischen Pulse durch die Kabel, der Laufzeit des Lichts durch den optischen Aufbau und der jeweiligen Anstiegszeit. Für den TVIS ist das die Zeit, in der die stehende akustische Welle im AOM abklingt, für die Sepia maximal der Abstand zweier Pulse bei der vorgegebenen Repetitionsrate. Abb. 4.12 dokumentiert die jeweiligen Zeiten. Der Unterschied von $\Delta t_r = 143,5 \text{ ns}$ entspricht in der mit 160 MHz laufenden Steuerungsschleife ca. 23 Takten, die als Mindestpause eingetragen werden muss.

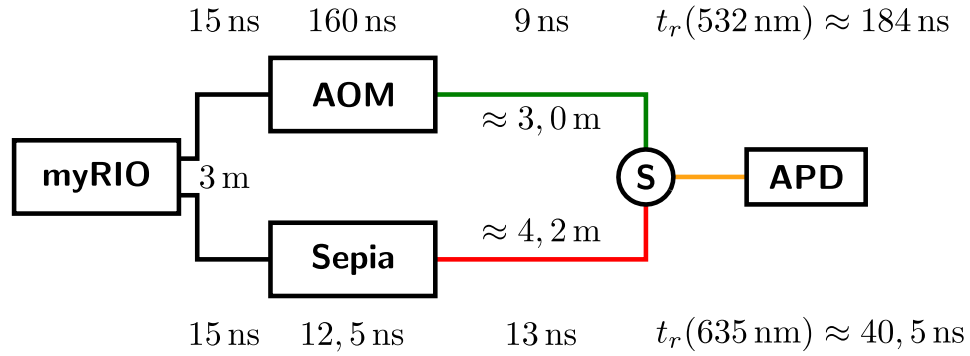


Abbildung 4.12.: Die Pulse der Sepia erreichen die Probe um $\Delta t_r = 143,5 \text{ ns}$ schneller als die des TVIS.

4.2.4. Mikrosekunden-Pump-Probe: Experimentelle Resultate

Der MSPP-Modus wird mit einer Lösung von MC540 in Ethanol getestet. Dieselbe Probe wurde sauerstofffrei und sauerstoffgesättigt vermessen. Letztere wurde zusätzlich ohne Abfragelaser vermessen, um die Dunkelzählrate zu bestimmen. Die in Schritten von $0,5 \mu\text{s}$ mit

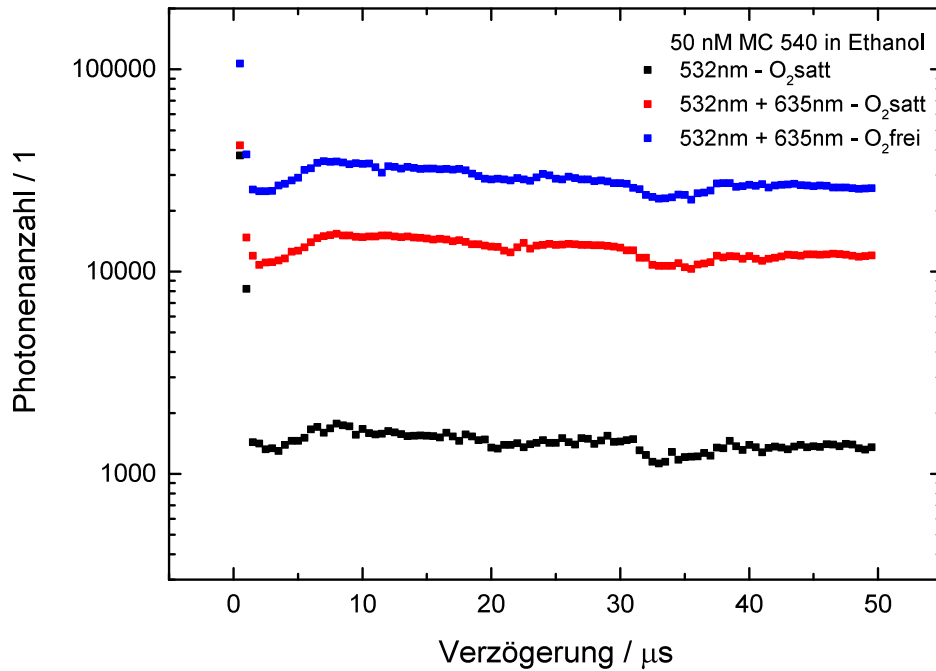


Abbildung 4.13.: Rohdaten der MSPP-Messungen von MC540 in Ethanol.

jeweils 10^6 Zyklen pro Verzögerung von Pump- und Abfragepuls gemessenen Photonenzahlen sind in Abb. 4.13 dargestellt. Die Daten deuten bereits unaufbereitet auf Probleme hin: Ungewöhnlich sind die enorm hohen Zählraten bei $\Delta t = 0,5 \mu\text{s}$ und $1 \mu\text{s}$, die unperiodischen Einbrüche der Zählrate und die identischen Verläufe der Kurven für die sauerstofffreie und gesättigte Messung.

Der Triplettzustand in sauerstoffgesättigter Atmosphäre hat eine Lebensdauer von $\tau_T^{ox} = 0,67 \mu\text{s}$. [47] Dies könnte die sehr schnelle Relaxation unterhalb von $1 \mu\text{s}$ erklären, jedoch nur, falls sie nicht auch im sauerstofffreien Fall und sogar ohne den RISC-auslösenden Laser auftreten würde. Dass diese Ausschläge nicht auftreten, wenn wie in Abb. A.4.3 nur der Hintergrund detektiert wird, spricht dafür, dass hier primäre Fluoreszenz detektiert wird. Die Verzögerung wurde gemäß Abschnitt 4.2.3 korrigiert, sodass hier ein Fehler bei der Synchronisation der Echtzeitprogrammebenen in der MSPP-Software vorliegen muss.

Für die von Zählrate, Laserkombination und Farbstoff unabhängigen Zählrateneinbrüche wird eine andere Fehlerursache vermutet. Der vorherige Fehler spricht für eine absolute Verschiebung des Detektionsintervalls gegen das Pumpintervall um $\approx 1 \mu\text{s}$. Die Schwankungen

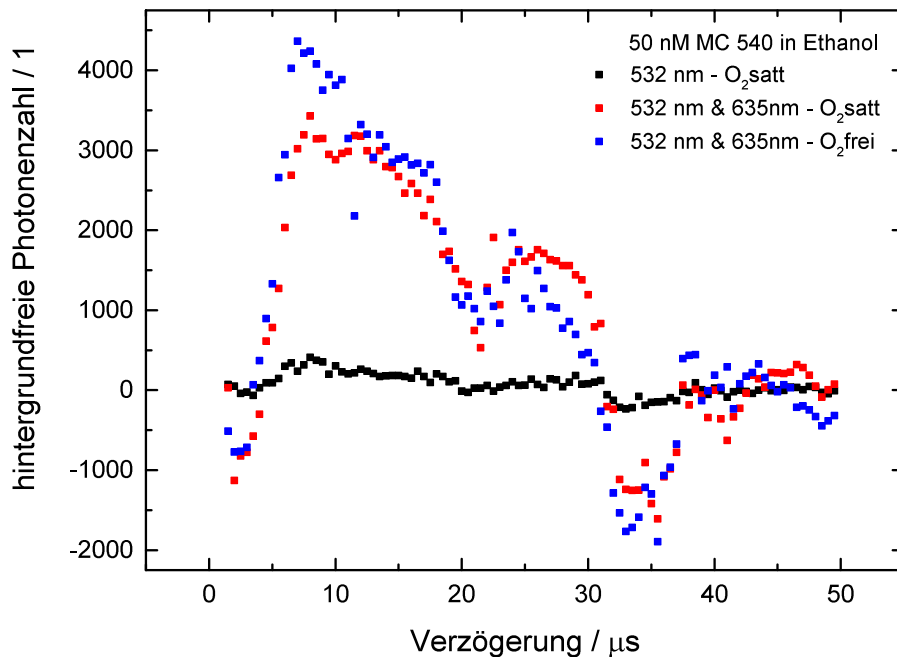


Abbildung 4.14.: Nach Abzug des Hintergrundes wird eine Abnahme der Photonenzahl mit zunehmender Verzögerung deutlich, die nicht mit RISC vereinbar ist.

der scheinbaren Detektionseffizienz könnten im RT-Teil der Software verursacht werden, wenn verzögerungsabhängig valide Photonenergebnisse verworfen werden.

Die atmosphärenunabhängig gleich verlaufenden Zählereigniskurven sprechen dafür, dass die detektierten Photonen nicht auf RISC zurückzuführen sind. Um die Verläufe deutlicher herauszustellen, wurde von den Kurven in Abb. 4.13 jeweils der Mittelwert der Photonenzahl zwischen $40\text{ }\mu\text{s}$ und $50\text{ }\mu\text{s}$ abgezogen. Eine monoexponentielle Anpassung an die Zerfälle in Abb. 4.14 liefert zwar eine Lebensdauer von $(10 \pm 2)\text{ }\mu\text{s}$, was in der Tat mit dem Literaturwert vereinbar ist.[135] Allerdings nur im Fall der sauerstofffreien Messung. Die Anwesenheit von Sauerstoff in der gesättigten Probe reduziert die tatsächliche Lebensdauer auf ca. 500 ps (vgl. Abb. 4.7 und [135]).

Eine Normierung der Kurven in Abb. 4.14 auf den Hintergrund zeigt sogar, dass auch die nicht abgefragte Probe den identischen Zeitverlauf aufweist. Dies lässt darauf schließen, dass in den Versuchen ausschließlich Streulicht detektiert wurde. Die unterschiedlichen Photonenzahlen können durch die Justage verursacht werden. Die mit zunehmender Verzögerung abnehmende Photonenzahl tritt zwar ausschließlich bei Anwesenheit von MC540 auf, erscheint nach der Normierung aber ebenfalls wie ein Artefakt des Versuchs.

Aufgrund der Schwierigkeiten, genügend Photonen für eine Auswertung zu sammeln, ohne dabei in der Sättigungsphase das Equipment zu zerstören, blieben die Unzulänglichkeiten der Programmierung zu lange unentdeckt. Ein Ansatz für die korrekte Programmierung des Telexperiments ist vorhanden. Nach dessen korrekter Implementierung sollten die Messungen wiederholt werden, da in Abschnitt 4.2.3 gezeigt wurde, dass genügend Photonen detektierbar sein müssen.

4.2.5. Weitere Schritte

Die begonnene Umprogrammierung des MSPP-Modus muss weitergeführt werden, sodass die registrierten Photonen mit konstanten Detektionsintervallen den korrekten Verzögerungen zugeordnet werden.

Beide DRS-Messmodi profitieren von einer Synchronisierung der APDs mit Laserpulsen, die sich auf zwei verschiedene Wege realisieren lässt. Erstens kann die Photonendetektion in den FPGA-Schleifen abhängig von der Verzögerung zwischen Pumpe und Abfrage aktiviert werden. Und zweitens kann über ein Relais mit ausreichend hohem Schaltstrom im Mikrosekundenmodus die Detektion während der Sättigungsphase komplett unterbunden werden.

Der TVIS ist annähernd im gesamten sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums nutzbar. Damit ermöglicht er die Anpassung der Abfragewellenlänge λ_d an das

Spektrum des untersuchten Farbstoffs, insbesondere an die pyrenbasierten Photosäuren. Dazu ist ein angepasster Dichroit und ein schmaler Bandpassfilter um λ_d notwendig, denn die Kontinuumsunterdrückung des Lasers alleine ist für diese spektroskopischen Zwecke unzureichend. Zusätzlich sollte der Laser gechirpt werden, um die Pulslänge und damit die Dumpeffizienz zu erhöhen.

MC540 kann nach Anregung aus dem Grundzustand viele nichtfluoreszierende Zustände einnehmen. Ein negativer Einfluss auf die Messbarkeit des RISC über Pump-Probe-Spektroskopie über die Annahmen in dieser Arbeit hinaus ist nicht auszuschließen. Es sollten daher andere Typen von Tripletsensitizern auf ihr Potential für RISC untersucht werden. Mögliche Kandidaten sind Übergangsmetallkomplexe oder Iodsubstituierte BODIPYs.[136] Das Modell für die transiente 2PE von MC540 ist ausbaufähig. Der Einfluss von cis-trans-Isomerie muss in einem nächsten Schritt bestimmt werden. Aufgrund der intensitätsabhängigen Zeitkonstante der Isomerisierung sind dazu Experimente mit variabler Pumpleistung notwendig.

4.3. Zeitaufgelöste 2PE-Fluoreszenzanisotropie

4.3.1. Die Bestimmung von τ_f und Ω_{TP}

Wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, werden zirkular und linear polarisierte 2PE-TCSPC-Kurven (C2PE bzw. L2PE) und eine linear polarisierte 1PE-TCSPC-Kurve (L1PE) von Terrylen in Squalen aufgenommen. Die Messparameter sind in Tab. 4.3 zusammengefasst. Die globale Anpassung mit einem zweifach exponentiellen Zerfall ergibt die Fluoreszenzlebensdauer von $\tau_f = 4,184\text{ ns}$ und eine weitere von $\tau_r = 326\text{ ps}$ mit einer Amplitude $A_r < 0,08A_f$. Abb. A.5.1 im Anhang verdeutlicht den geringen Beitrag von τ_r zum Gesamtprozess. Da die Einteilung der Polarisatoren in 2° -Schritten erfolgt, der Magic Angle aber auf wenige Winkelminuten genau eingestellt werden muss, erklärt residuelle Anisotropie das Auftreten von τ_r .

Da die 2PE-Kurven unter gleichen Bedingungen aufgenommen wurden, lassen sie sich in

Tabelle 4.3.: Wellenlänge λ , Leistung vor der Probe P , Integrationszeit t_{int} der *PicoHarp* und die mit allen Detektionspolarisationen gesammelten Photonen $N_p(\cdot)$.

	λ / nm	P / mW	t_{int}	$N_p(V)$	$N_p(H)$	$N_p(MA)$
L1PE	543	0,14	20	$1,78 \times 10^7$	$1,65 \times 10^7$	$3,74 \times 10^7$
L2PE	780	60	30	$3,09 \times 10^6$	$2,63 \times 10^6$	$3,92 \times 10^6$
C2PE	780	60	30	$3,85 \times 10^6$	$3,53 \times 10^6$	$4,19 \times 10^6$

Abb. 4.15 ohne weitere Anpassung auf ihr globales Maximum normieren und punktweise das Verhältnis berechnen. Wie zu erwarten war, ist $\Omega_{TP} = 0,896(2)$ fast im gesamten Messbereich konstant. Lediglich zu Beginn, unter Anisotropieeinfluss, variiert Ω_{TP} .

Damit weicht das Ergebnis von dem in Toluol ab:[44]

$$\Omega_{TP}(780 \text{ nm, Toluol}) = 0,74 < \Omega_{TP}(780 \text{ nm, Squalen}) = 0,896. \quad (4.11)$$

Die Lösemittelabhängigkeit von 2PE-Übergängen ist wohlbekannt, so sinkt Ω_{TP} für Perylen mit steigender Lösemittelpolarität.[23]

Übergänge mit $\Omega_{TP} = 3/2$ sind von den Nebendiagonalelementen dominiert, weisen also eine B_g Symmetrie auf; bei $\Omega_{TP} = 2/3$ verhält sich das Molekül wie ein lineares, also abgesehen von T_{xx} sind alle Tensorelemente gleich null.[82] Bei Werten dazwischen ist die Zuordnung zu einzelnen Übergängen ohne eine umfassende Polarisationsstudie nicht möglich.[81] Während die Anregung von Terrylen in Toluol also von dem A_g -Übergang

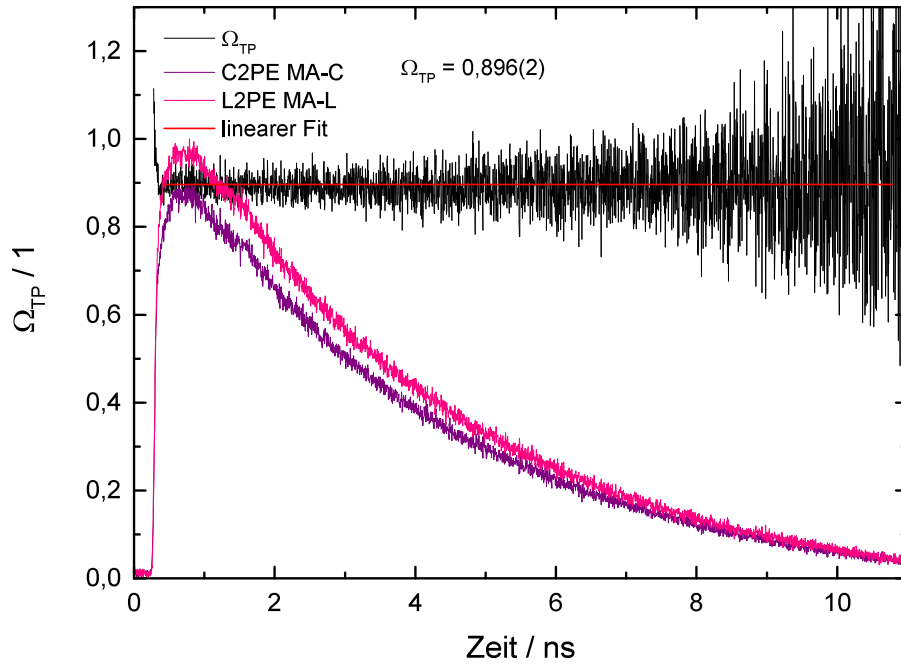


Abbildung 4.15.: Die unter dem passenden Magic Angle (MA-C bzw. MA-L) gemessenen Fluoreszenzzerfälle von Terrylen in Squalen bei zirkularer (C2PE) und linearer (L2PE) Anregung. Ω_{TP} ist das punktweise Verhältnis der Kurven.

Tabelle 4.4.: Resultate der globalen Anpassung an die Anisotropiezerfälle bei zirkularer (C2PE) und linearer (L2PE) 2PE sowie linearer 1PE (L1PE).

	L1PE	L2PE	C2PE
β_a	0,224	0,278	-0,104
ϕ_a / ns		0,428 ^a	
β_b	0,121	0,143 ^b	-0,104
ϕ_b / ns		1,210 ^a	

^a Global angepasster Wert

^b Konstant aus der Theorie

dominiert wird, ist der Übergang in Squalen von deutlich gemischtem Charakter, trotz der nur geringfügigen bathochromen Verschiebung des S_1 von 2 nm (vgl. Tab. A.3). Interessant ist auch, dass Terrylen in Squalen (Te) und Perylen in Squalan (Pe) mit $\Omega_{TP}(\text{Pe}) = 0,92[23]$ den praktisch identischen Charakter aufweisen.

Dass aus Ω_{TP} nicht der vollständige Charakter des Übergangs bestimmt werden kann ist unbefriedigend. Die zuvor erwähnte Polarisationsstudie ist nur möglich, wenn verschieden polarisierte Photonen erzeugt werden. Auf Grund der notwendigen Überlagerung der getrennten Laserstrahlen in Raum und Zeit ist dies für ein Küvettenexperiment nicht durchführbar.

Eine Lösung, die mit identischen Photonen auskommt ist die in Abschnitt 2.2.3 vorgestellte 2PE-Fluoreszenzanisotropie, die im Folgenden ausgewertet wird..

4.3.2. Anpassung der Anisotropiezerfälle

Die globale Anisotropieanpassung gelingt mit einem biexponentiellen Modell. Demnach kann die Rotation von Terrylen in Squalen als die eines oblaten Moleküls angesehen werden. Die wesentlichen Parameter der Anpassung sind in Tab. 4.4 zusammengefasst.

Der Index b wurde mit der Festlegung von $\beta_b(\text{L2PE}) = r_0^l$ den irreduziblen Komponenten r_0^i zugeordnet und somit a den Komponenten r_2^i , jeweils mit $i \in \{1, l, c\}$. Die Rotationskorrelationszeiten wurden erst durch Festlegung von Startwerten, $\phi_a^s = 0,3$ ns und $\phi_b^s = 1$ ns, reproduzierbar den passenden Komponenten zugeordnet, welche sich aus den Beiträgen der Rotationsdiffusionskoeffizienten in (2.26) ergeben. Dass ohne zur Theorie passende Startwerte lokale Minima gefunden werden können, bei denen die Zuordnung von Korrelationszeit und Amplitude gerade vertauscht ist, spricht für ein instabiles System mit vielen Korrelationen zwischen den Parametern. Die Konfidenzintervalle der Parameter in Tab. 4.4 liegen dann aber jeweils bei weniger als $\pm 10\%$ des angepassten Werts.

Der Vergleich der hydrodynamischen Volumina mit denen in [23] bei Raumtemperatur bzw. 14° C mit $V_x(\text{Pe}) \approx 12V_z(\text{Pe})$ zeigt, dass

$$\begin{aligned} V_x(\text{Te}) &\approx 3,7 V_z(\text{Te}) \\ V_x(\text{Te}) &\approx 2,4 V_x(\text{Pe}) \\ V_z(\text{Te}) &\approx 7,8 V_z(\text{Pe}), \end{aligned} \tag{4.12}$$

für $\eta(\text{Squalen}) = 15 \text{ mPa s}$, $\eta(\text{Squalen}) = 29 \text{ mPa s}$ und $\phi_0(\text{Pe}) \approx 1 \text{ ns}$.

Da Terrylen um den Faktor 1,62 länger ist als Perylen, liegt die Steigerung des hydrodynamischen Volumens V_x bei Rotationen aus der Molekülebene heraus im erwartbaren Bereich zwischen 1,62 und $1,6^2 = 2,6$. Wenn Terrylen bzw. Perylen sich bei Rotation um e_z verhält wie eine Kugel mit Radius l_{Te} (l_{Pe}), sollte aber $\frac{V_z(\text{Te})}{V_z(\text{Pe})}$ nicht höher sein als $1,62^3 = 4,25$. Die beobachtete Abweichung kann folgende Ursachen haben:

Die dritte Naphtaleneinheit lässt die oblate Näherung für die Rotationsdiffusion von Terrylen zusammenbrechen. Prolat, also monoexponentiell, lassen sich die experimentellen Daten nicht anpassen. In Folge muss für eine allgemeine Rotation der Zusammenhang zwischen den Anisotropiekoeffizienten und den Tensorelementen herausgearbeitet werden. Möglich ist auch, dass der tensorielle Charakter des Diffusionskoeffizienten seine Auswirkungen zeigt und $\frac{V_x(\text{Te})}{V_z(\text{Te})} \approx 3,7$ unterschätzt wird. Für die Behandlung mit dem Debye-Stokes-Einstein-Gesetz ist es notwendig, dass die Rotation als Diffusion aufgefasst werden kann. Squalen muss für Terrylen also eine kontinuierliche Umgebung darstellen, was aufgrund ihrer vergleichbaren Größe nicht gegeben sein kann. Das Gesetz verliert auch seine Gültigkeit, wenn lokale Wechselwirkung die diffusive dominieren.[137] Dies könnte für die Wechselwirkung der π -Elektronen des Squalen mit den aromatischen Systemen des Terrylen gegeben sein.

4.3.3. Die Lösung des Gleichungssystems (2.40)

Tab. 4.4 enthält die fehlenden Werte der linken Seite von (2.40), welches nun Gestalt (4.13) annimmt.

Es sei daran erinnert, dass darüber hinaus $r_2^l = 1/7$ und $\sum_{i,j} T_{ij}^2 \equiv 1$ gilt.

Die Lösungen von (4.13) sind in Abb. 4.16 dargestellt. Der maximale Winkel $\alpha_z^m = 23^\circ$ ergibt sich aus der Bedingung $r_f^1 = r_0^1 + \left| \frac{2\alpha_z}{\sin(2\alpha_z)} \right|^2 r_2^1 = 0,121 + 1,2456 \times 0,224 = 0,4$. Die fundamentale Anisotropie für Terrylen ist nicht bekannt, mit der maximalen Anisotropie als Grenze wird der gesamte physikalisch mögliche Wertebereich abgedeckt.

Neben f^l und f^c , den jeweiligen B_g -Anteilen am Übergang, sind die Verhältnisse $\frac{T_{xx}}{T_{yy}}$ und $\frac{T_{xy}}{T_{yy}}$ dargestellt. Rein negative $\frac{T_{xy}}{T_{yy}}$ lösen (4.13) ebenso. Die beiden Tensorverhältnisse genügen aufgrund der Normierungsbedingung.

$$\begin{aligned}
 r_2^l = 0,278 &= \left| \frac{\sin(2\alpha_z)}{2\alpha_z} \right|^2 (1 - f^l) \frac{3}{7} \frac{3T_{xx}^2 + 3T_{yy}^2}{3T_{xx}^2 + 3T_{yy}^2 + 2T_{xy}^2} \\
 r_0^c = -0,104 &= -(1 - f^c) \frac{1}{14} \frac{T_{xx}^2 + T_{yy}^2 - 4T_{xx}T_{yy}}{T_{xx}^2 + T_{yy}^2 - T_{xx}T_{yy}} - f^c \frac{1}{7} \\
 r_2^c = -0,104 &= -\left| \frac{\sin(2\alpha_z)}{2\alpha_z} \right|^2 (1 - f^c) \frac{3}{14} \frac{T_{xx}^2 - T_{yy}^2}{T_{xx}^2 + T_{yy}^2 - T_{xx}T_{yy}} \\
 \Omega_{TP} = 0,896 &= \frac{2T_{xx}^2 + 2T_{yy}^2 - 2T_{xx}T_{yy} + 6T_{xy}^2}{3T_{xx}^2 + 3T_{yy}^2 + 2T_{xx}T_{yy} + 4T_{xy}^2}.
 \end{aligned} \tag{4.13}$$

Aus Abb. 4.16 geht hervor, dass der Beitrag des B_g -Zustandes abnimmt, je höher die fundamentale Anisotropie ist. Dies ist zu erwarten, da dies mit einem geringeren mittleren Winkel der Anregung zum Emissionsdipol $\boldsymbol{\mu}_{DP} \parallel \mathbf{e}_x(M)$ einher geht. Das Verhältnis $\frac{f^l}{f^c} \approx 0,6$ bleibt auch bei zunehmendem α_z konstant. Dass die Nebendiagonalelemente T_{xy} aufgrund des elektrischen Feldes bei zirkular polarisierter Anregung eine größere Rolle spielen als bei linear polarisierter ist zu erwarten.

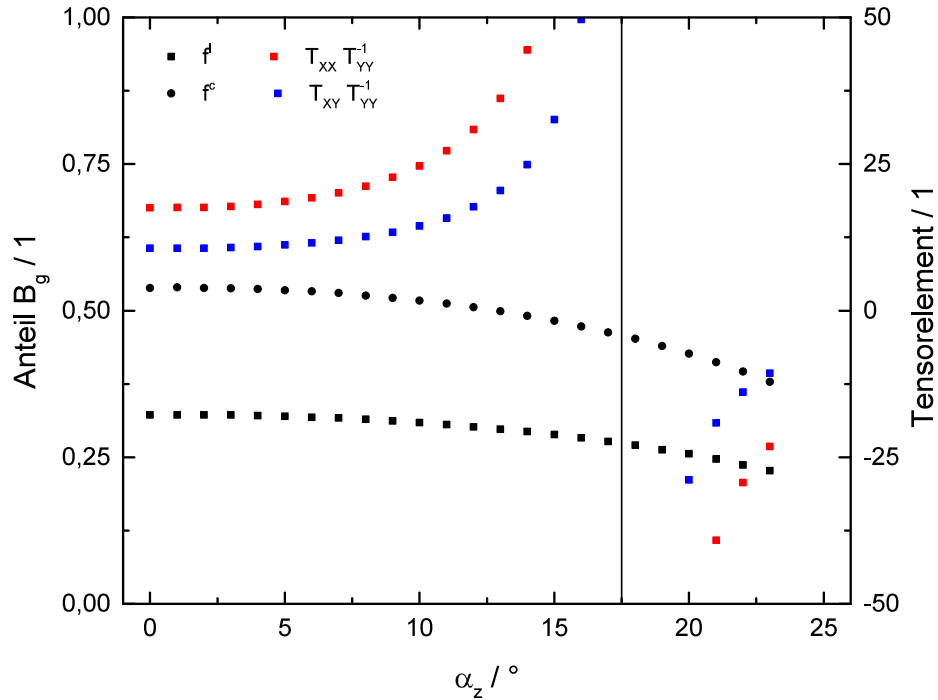


Abbildung 4.16.: Auftragung der B_g -Anteile f^l und f^c sowie der Tensorelementverhältnisse T_{xx}/T_{yy} und T_{xy}/T_{yy} gegen den freien Parameter α_z .

Die Interpretation der Tensorelemente ist schwieriger, denn die Polstelle im Wertebereich bedeutet, dass bei einer initialen Rotation von ca. $17,5^\circ$, und somit einem durchaus üblichen Wert von $r_f^1 = 0,373$ für die fundamentale Anisotropie,[78] T_{yy} verschwindet. Das Ergebnis für Ω_{TP} schließt einen solchen Tensor aus und ist der Grund f^l und f^c überhaupt einzuführen. Darüber hinaus ist unter diesen Bedingungen $r_f^l = 0,49 < 0,57$, obwohl für dominantes T_{xx} die fundamentale 2PE-Anisotropie maximal werden sollte.

4.3.4. Modifizierte Anpassungsparameter

Unter Berücksichtigung der Interpretation der Ergebnisse muss die Anpassung an die Anisotropiekurven wiederholt werden. Die bisherigen in die Anpassung einfließenden Annahmen sind die aus der Theorie stammende Bedingung $r_0^l = 1/7$, der notwendig gleichen Rotationskorrelationszeiten für alle Anregungen und der zuvor experimentell bestimmten Fluoreszenzlebensdauer $\tau_f = 4,184$ ns. Der kleinstmögliche Satz an Annahmen und die damit erfolgende Minimierung von χ_{red}^2 liefert keine plausiblen Ergebnisse. Es muss mindestens eine Zusatzannahme getroffen werden, wodurch auch der „best-fit“-Ansatz, also die Minimierung von χ_{red}^2 , verworfen wird.

In Abb. A.5.3 ist zu erkennen, dass die Messwerte nach der Anstiegsphase einen Doppelpeak aufweisen. Dieser kann, wie auch die Schulter nach 1,3 ns, durch einen Reflex des Anregungslasers ausgelöst werden und zu einer Überschätzung von r_2^l führen. Der Reflex ist bei paralleler Polarisierung von Anregung und Emission am stärksten, was seine Abwesenheit bei allen anderen Polarisatorstellungen erklären kann. Aufgrund der Messung mit dem TVIS erfasst die IRF weder diesen noch andere Reflexe durch die intensive Anregung bei 780 nm. Im Folgenden wird willkürlich $r_2^l = 0,2$ gesetzt. Die modifizierte Kurve in Abb. A.5.3 erreicht damit den experimentellen Kurvenverlauf nicht mehr, die Wahl eignet sich dennoch zur Illustration des sehr großen Bereichs möglicher Lösungen.

Tabelle 4.5.: Resultate der modifizierten Anpassung an die Anisotropiezerfälle.

	L1PE	L2PE	C2PE
β_a	0,250	0,200 ^c	-0,074
ϕ_a / ns		0,531 ^a	
β_b	0,082	0,143 ^b	-0,104
ϕ_b / ns		1,258 ^a	

^a Global angepasster Wert

^b Konstant aus der Theorie

^c Wert manuell gesetzt

Tab. 4.5 fasst die wichtigen Parameter der modifizierten Anpassung zusammen. Die Verringerung von $r_2^l = \beta_a(\text{L2PE})$ führt bei der globale Anpassung im Wesentlichen zu einer Erhöhung von ϕ_2 um 25 %. (4.14) ist (4.12) berechnet mit den Rotationskorrelationszeiten der modifizierten Anpassung. Die noch größere ϕ_2 trägt nicht zur Lösung des Problems des übergroßen Verhältnis $\frac{V_z(\text{Te})}{V_z(\text{Pe})}$ bei.

$$\begin{aligned} V_x(\text{Te}) &\approx 3,1 V_z(\text{Te}) \\ V_x(\text{Te}) &\approx 2,5 V_x(\text{Pe}) \\ V_z(\text{Te}) &\approx 9,6 V_z(\text{Pe}), \end{aligned} \quad (4.14)$$

Mit steigender Lebensdauer ϕ_2 verringert sich r_2^c . Während sich die initiale Anisotropie bei 2PE folgerichtig abnimmt, bleibt diese bei 1PE mit $r^1(0) = 0,332$ fast konstant gegenüber dem unmodifizierten Fall mit $r_u^1(0) = 0,345$. Dazu muss der Beitrag der langsamen Komponente zur Anisotropie sinken, was gegenläufig zur Entwicklung bei 2PE ist, da hier bei

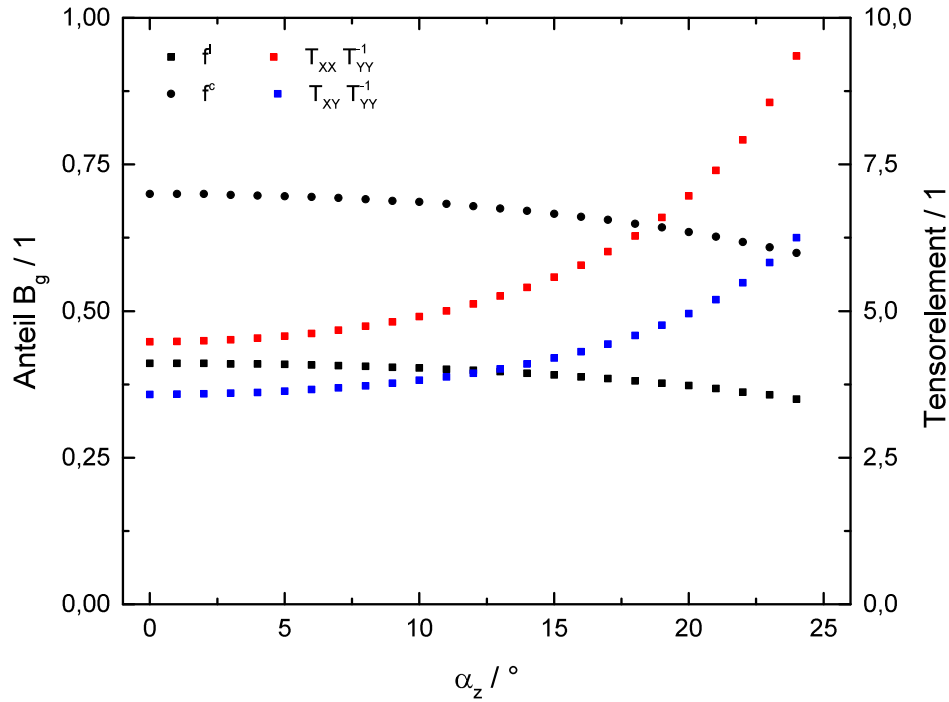


Abbildung 4.17.: Auftragung der B_g -Anteile f^l und f^c sowie der Tensorelementverhältnisse T_{xx}/T_{yy} und T_{xy}/T_{yy} gegen α_z für die modifizierte Anpassung.

konstantem r_0^i (willkürlich) r_2^i verringert wurde.

Aufgrund der insgesamt niedrigeren 2PE-Anisotropie, enthält Abb. 4.17 die Werte links der Polstelle in Abb. 4.16, fortgesetzt zu niedrigeren $r^i(0)$. Mit der nur geringfügigen Änderung von $r^1(0)$ ist auch der physikalisch sinnvolle Bereich für initiale Rotationen kaum verändert, es gilt $\alpha_z^m = 24^\circ$.

Einen Hinweis darauf, dass $r_2^l = 0,2$ keine allzu schlechte Wahl sein könnte, liefert der erneute Vergleich mit Perylen. Dessen Tensorelemente liegen bei $\frac{T_{xx}}{T_{yy}} \approx 9$ bzw. $\frac{T_{xy}}{T_{yy}} \approx 7$ und werden hier für α_z^m gerade erreicht. Obwohl Terrylen mit der dritten Naphtaleneinheit einen deutlich lineareren Charakter haben sollte, zeigen die ähnlichen Ω_{TP} , dass dies zumindest für die vorliegende Lösemittelwahl nicht gilt. Ähnliche Verhältnisse der Tensorelemente überraschen daher nicht. Die schwache elektronische Kopplung zwischen den Naphtaleneinheiten im Vergleich zu der innerhalb kann dies verursachen. Sie äußert sich nicht nur in zwei verschiedenen Bindungslängen, auch die Übergangsdichte bei Absorption zeigt bei den Verbindungen der Naphtalene einen Knoten.[138] Werden aber beim Übergang in höhere Zustände Bereiche der Moleküle voneinander isoliert, kann die Ladungsdichteumverteilung nicht wie bei einem linearen Molekül erfolgen.

Abschließend kann festgehalten werden, dass Zweiphotonenanregung bei 780 nm in einen rein totalsymmetrischen A_g -Zustand für Terrylen in Squalen nicht mit den experimentellen Daten vereinbar ist.

4.3.5. Qualitativer Vergleich der Anpassungsvarianten

Neben der physikalischen Sinnhaftigkeit der verschiedenen Anpassungen an die Anisotropiezerfälle soll nun die mathematische Plausibilität der Lösungen diskutiert werden. Dazu eignen sich die in Tab. 4.6 aufgelisteten χ_{red}^2 -Werte beider Anpassungen und die relative Erhöhung durch die Modifikation. Weiterhin müssen die Residuen in Abb. A.5.7 bis Abb. A.5.9 beachtet werden.

Tabelle 4.6.: Vergleich der Qualität der Anpassungen.

	$\chi_{red}^2(ges)$	$\chi_{red}^2(L1PE)$	$\chi_{red}^2(L2PE)$	$\chi_{red}^2(C2PE)$
best fit	1,155	1,146	1,219	1,101
modifiziert	1,123	1,155	1,405	1,110
$\delta\chi_{red}^2$	0,059	0,008	0,093	0,008

Die Erhöhung von $\chi_{red}^2(L2PE)$ wurde durch die willkürliche Anpassung von r_2^l in Kauf genommen. Abb. A.5.8 zeigt, dass sich die Abweichung vom Optimum auf kurze Zeiten

< 1 ns beschränkt, was durch die Festsetzung von r_0^l einzig durch die Anpassung der Lebensdauern erreicht wird. Für die 1PE- bzw. zirkulare 2PE-Anisotropie stehen genügend Freiheitsgrade zur Verfügung, sodass selbst bei global festgelegten Rotationskorrelationszeiten die praktisch identischen Anpassungskurven wie im nicht modifizierten Fall erreicht werden.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei den Messungen zu Abb. A.5.3 Streulicht der intensiven Laserpulse des TNIR detektiert wurde. Bei kurzen Zeiten $t_{abs} \approx 0,5$ ns lässt sich ein Doppelpeak erahnen. Die Unterdrückung des Filters aus *BG39* muss überprüft werden.

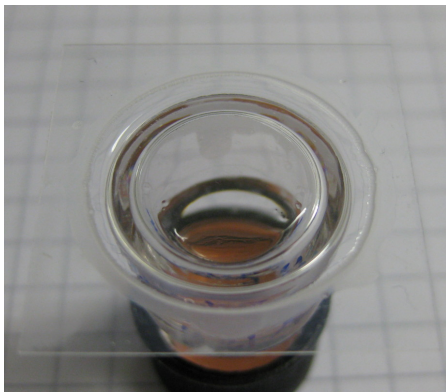
In Abschnitt 2.1.2 wurde bereits darauf hingewiesen, dass mit steigender Zahl freier Parameter theoretischer Modelle die Gefahr der Überanpassung an die gemessenen Daten zunimmt. Damit wächst auch die Gefahr, schwierig zu erkennende Artefakte als Eigenschaften der gemessenen Probe anzupassen. Nicht immer zeigt sich wie im vorliegenden Fall ein unerwartetes Verhalten (vgl. Abb. 4.16) bei der weiteren Auswertung. Komplexe Modelle mit vielen Freiheitsgraden besitzen eine große Menge akzeptabler Lösungen, sodass auch mit Artefakten behaftete Messungen problemlos angepasst werden. Aus diesem Grunde muss jede Datenerfassung mit der größtmöglichen Sorgfalt vorbereitet und durchgeführt werden. Bei der anschließenden Auswertung ist die physikalische Plausibilität der angepassten Resultate stets zu beachten.

4.3.6. Weitere Schritte

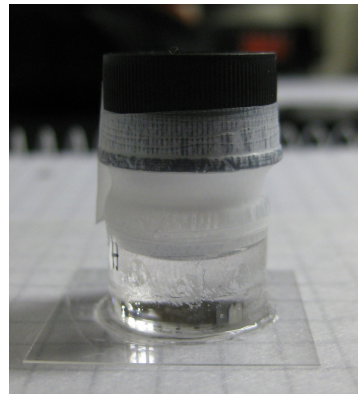
Die Tieftemperaturmessungen zur Bestimmung der fundamentalen Anisotropie müssen mit einer anderen Kühlstrategie wiederholt werden. Des Weiteren kann eine erneute Messung der linear polarisierten 2PE-Anisotropiekurven mit nochmals erhöhter Unterdrückung des Anregungslasers den Einfluss der Streuung klären. Es ist weiterhin unklar, welche der in Abschnitt 4.3.2 erwähnten Ursachen zur Abweichung des gemessenen hydrodynamischen Volumens von Terrylen zum erwarteten führt. Die Frage kann auf zwei Arten angegangen werden: Zum einen kann der Zusammenhang zwischen Tensorelementen und Anisotropiekoeffizienten für allgemeine Rotationen ($D_x \neq D_y \neq D_z \neq 0$) hergeleitet und die experimentellen Daten mit diesem Ansatz ausgewertet werden. Die zweite Möglichkeit ist ein Vergleich der Messungen mit Terrylen im doppelbindungsfreien Squalan. Ändert sich dort das Verhältnis der Rotationskorrelationszeiten signifikant, haben die Doppelbindungen einen isotropen Einfluss auf die Rotationseigenschaften. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass Terrylen in Squalan als ein oblat rotierendes Molekül beschrieben werden kann, dessen Übergang in den S_2 nicht durch einen rein totalsymmetrischen Tensor erklärt werden kann.

A. Ergänzende Abbildungen und Tabellen

A.1. Experimentvorbereitung



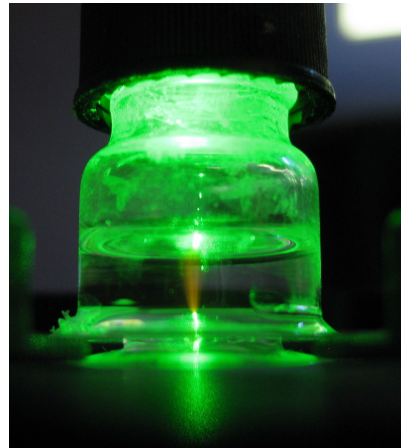
(a) Der Boden einer leeren Probenkammer.



(b) Verschlossene Probenkammer nach einer Messung.

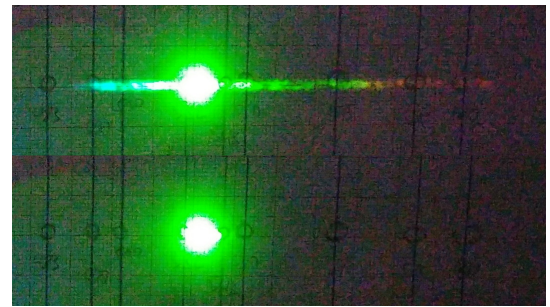
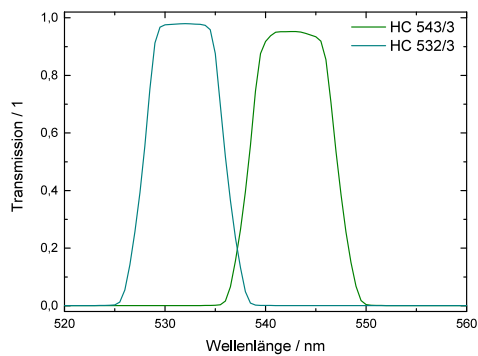


(c) Spülvorgang mit Argon.



(d) Anregung von sauerstoffgesättigtem MC540 in EtOH bei 532 nm.

Abbildung A.1.1.: Die Probenkammer in verschiedenen Stadien.



(a) Transmissionsspektren beider Filter.

(b) Emission bei 532 nm mit und ohne Filter

Abbildung A.1.2.: Ohne schmalbandige Filter ist das durch ein Gitter aufgetrennte residuelle Kontinuum mit dem Auge erkennbar.

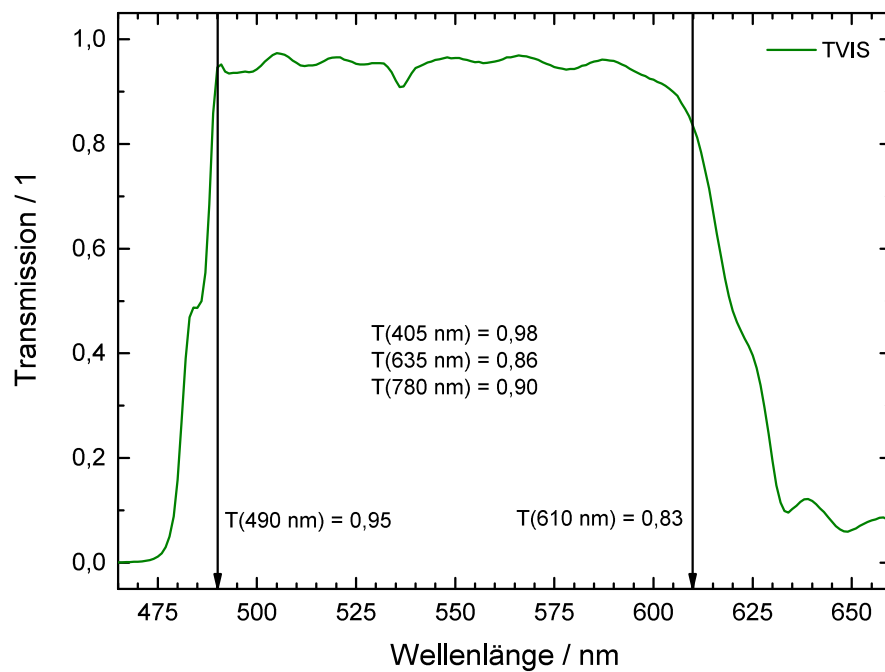


Abbildung A.1.3.: Gesamttransmissionseffizienzen der verwendeten Laser durch die Strahlteilerkaskade.

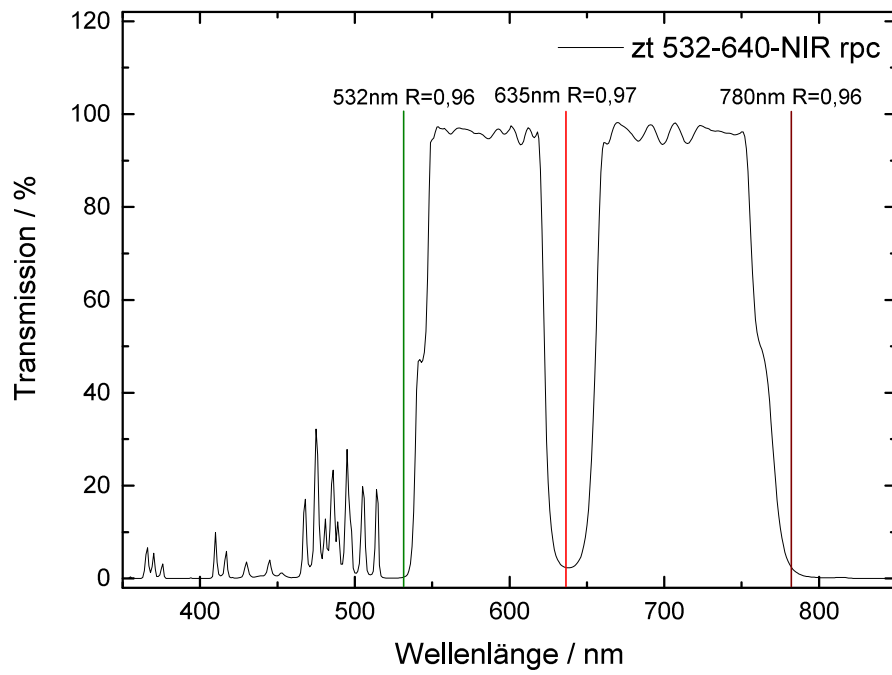


Abbildung A.1.4.: Transmissionsspektrum des *Chroma zt 532-640-NIR rpc*.

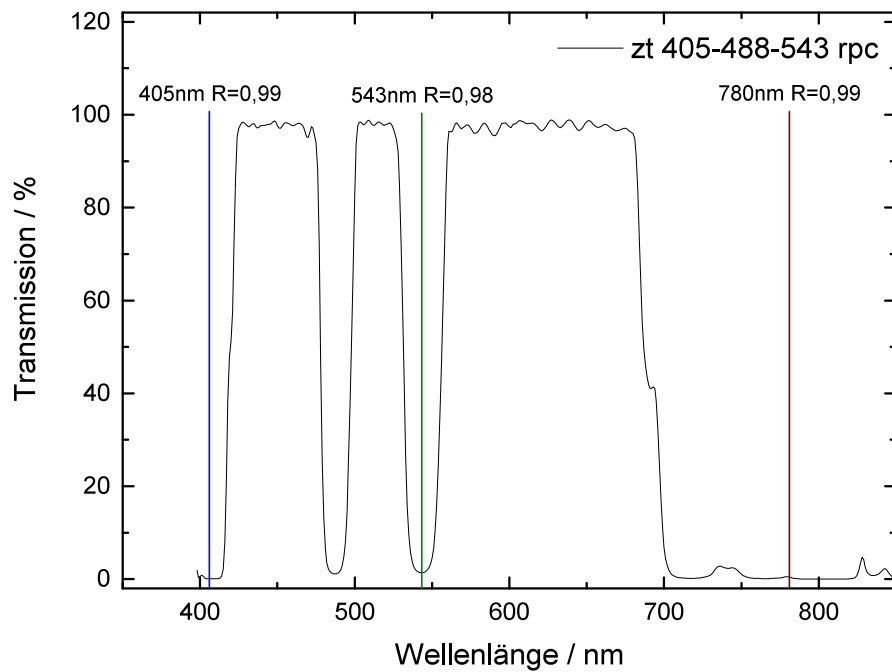


Abbildung A.1.5.: Transmissionsspektrum des *Chroma zt 405-488-543 rpc*.

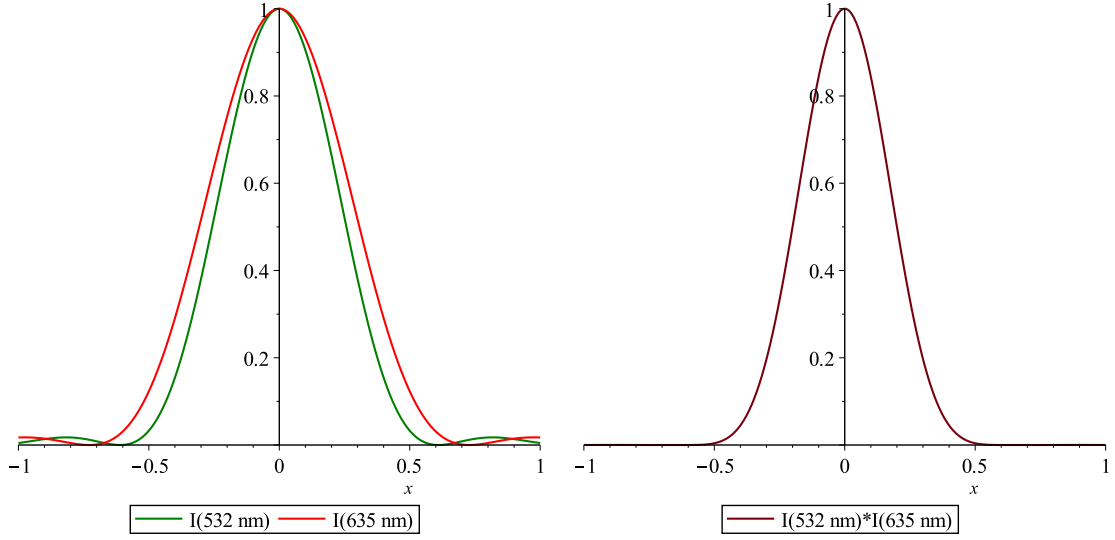


Abbildung A.1.6.: links: Intensitäts-Airyscheiben für 532 nm und 635 nm gegen einen parametrisierten Abstand vom Aperturmittelpunkt.
rechts: Über 99 % der kombinierten Intensität liegen innerhalb der ersten Nullstellen der Scheibe von 532 nm.

Tabelle A.1.: Parameter für die numerischen Simulationen zur Pump-Dump-Spektroskopie von Photosäuren.

	405 nm & 630 nm	532 nm & 635 nm	532 nm & 780 nm
σ/cm^2	10^{-16}	10^{-16}	10^{-16}
k_{ESPT}/ps^{-1}	0, 1	0, 01	0, 1
k_{RP}/ps^{-1}	0, 1	0, 01	0, 1
k_F/ns^{-1}	10	0, 5	10
k_V/ps^{-1}	1	1	1
$\langle P \rangle /mW$	0, 2 & 4	1 & 4	1 & 100
τ/ps	10 & 0, 1	0, 1 & 400	0, 1 & 0, 1
t_e/ps	20	1	1
t_s/ps	3 – 70	50 – 1000	3 – 60
$\Delta t_{sim}/ps$	500	10000	100

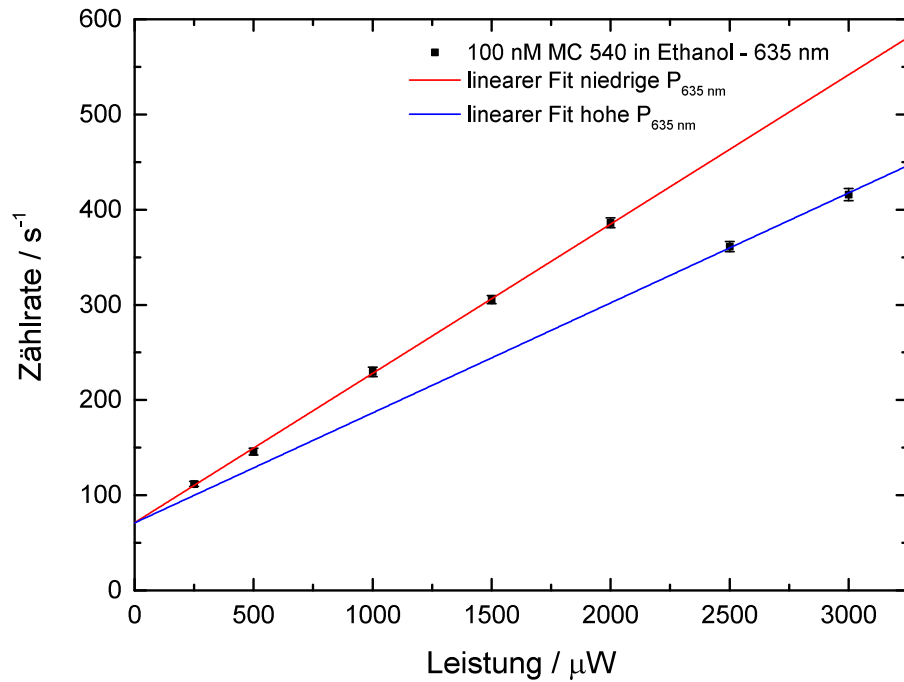


Abbildung A.1.7.: Zwei Pulsbereiche der P-C-635B können anhand der Streuung in den Detektionsstrahlengang unterschieden werden.

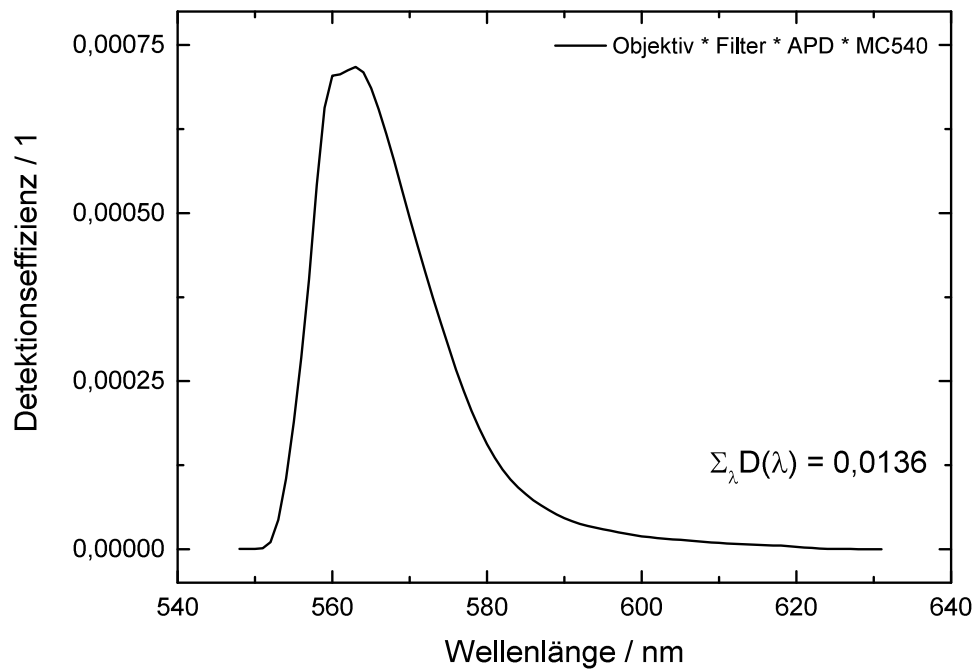


Abbildung A.1.8.: Die summierte Detektionseffizienz für Fluoreszenzphotonen aus MC540 in Ethanol beträgt 0,0136.

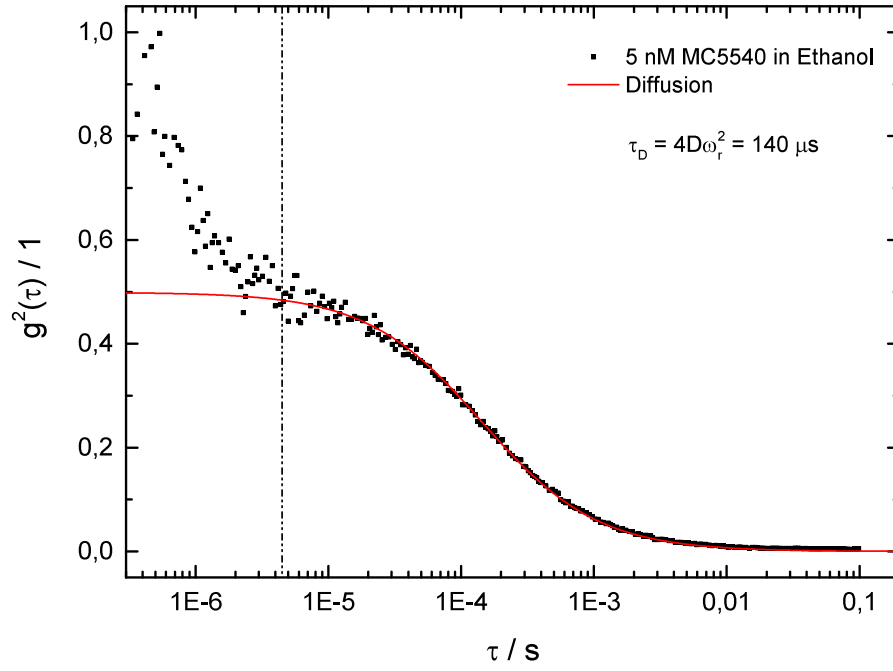


Abbildung A.1.9.: Fluoreszenzkorrelationskurve einer sauerstoffgesättigten 5 nM Lösung von MC540 in Ethanol. Die Diffusionszeit durch das konfokale Volumen beträgt $140 \mu s$, die mittlere Molekülanzahl $\langle N \rangle = 2$.

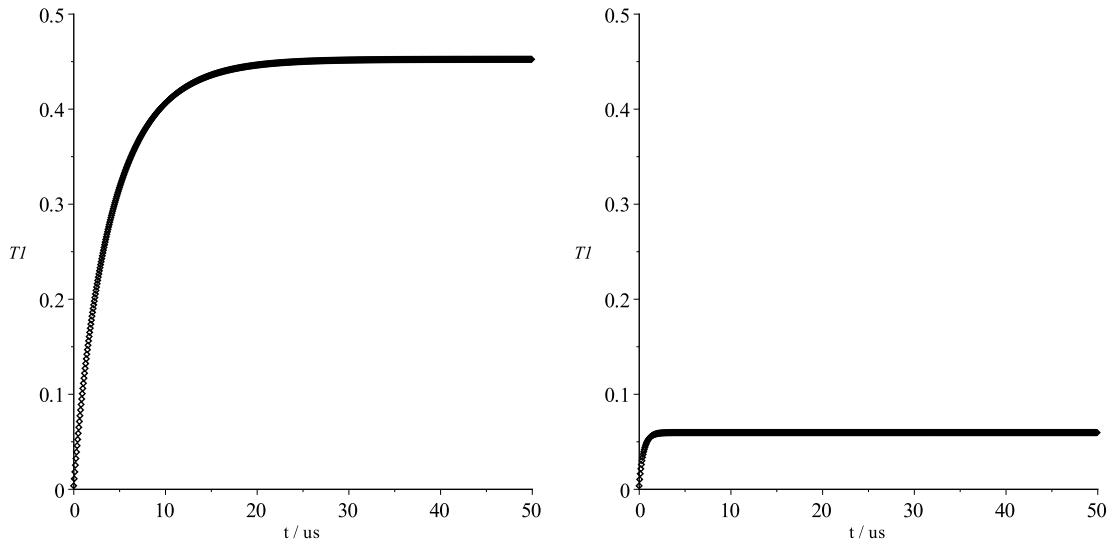


Abbildung A.1.10.: Einstellphasen der Besetzung des Triplettzustandes von MC540 gemäß (4.10). Links sauerstofffrei, rechts sauerstoffgesättigt mit $k_{T,O_2} = 10k_T$.

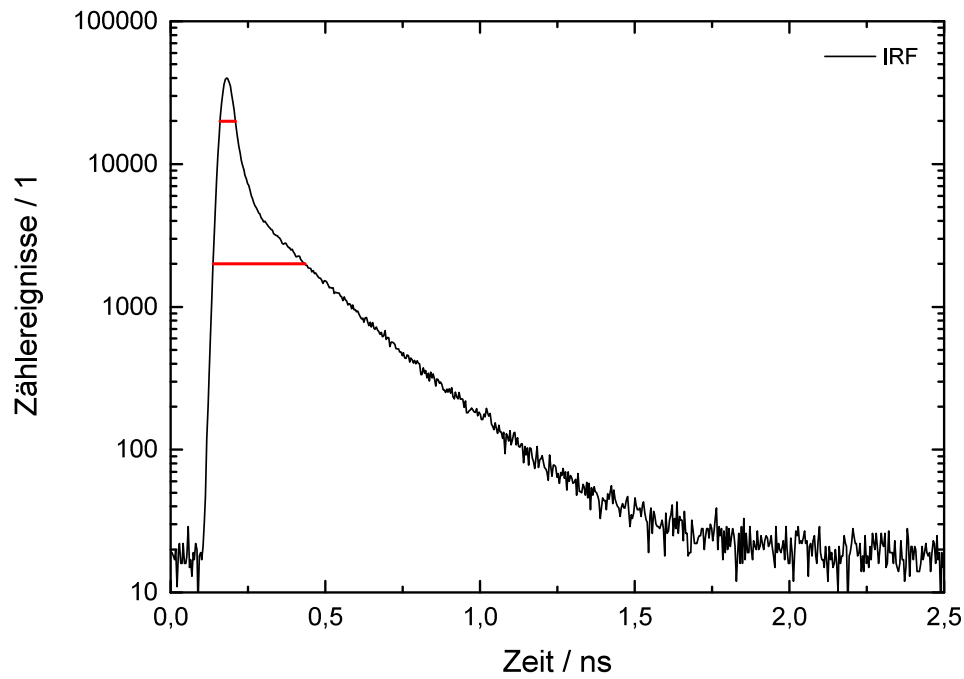


Abbildung A.1.11.: Die Halbwertsbreite des dominanten Teils der IRF bei 590 nm beträgt 49 ps, die der Basis 297 ps.

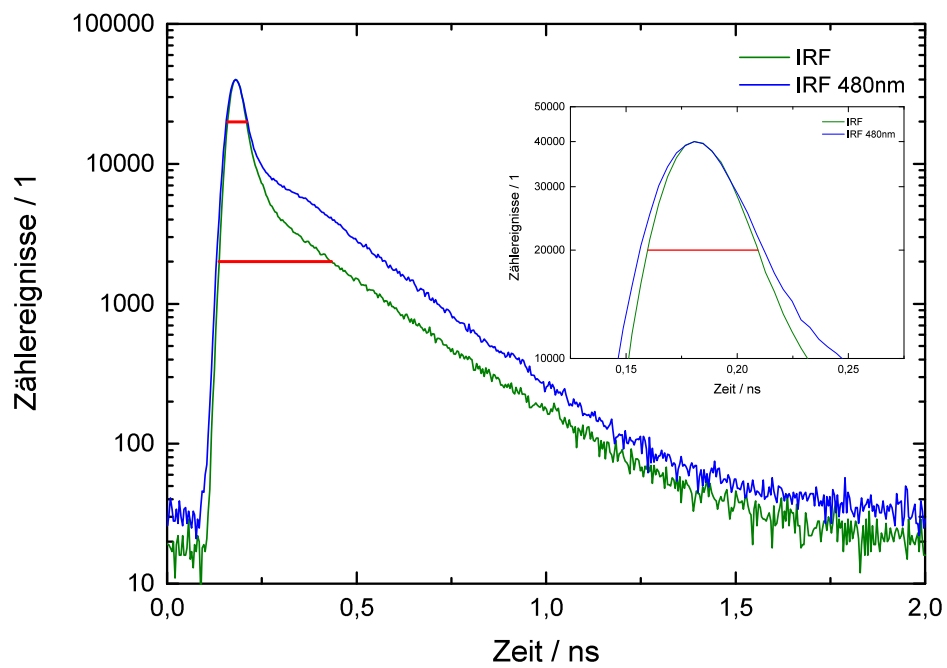


Abbildung A.1.12.: Vergleich der IRF bei 590 nm und 480 nm.

A.2. UV-VIS- und Fluoreszenzspektren

Tabelle A.2.: Liste aller verwendeten Chemikalien.

Lösungsmittel	Reinheitsgrad	Hersteller
Dimethylsulfoxid	Analytical Reagent Grade 99,99 %	Fisher Scientific
Ethanol	Analytical Reagent Grade 99,99 %	Fisher Scientific
Glycerin	99+ % Pure	Acros Organics
Nonan	ReagentPlus® 99 %	Sigma Aldrich
1-Octanol	99 % Pure	Acros Organics
1,2-Propandiol	puriss. p. a. $\geq 99,5$ %	Sigma Aldrich
Squalen	99+ %	Acros Organics
Toluol	99,85 % Extra Dry AcroSeal®	Acros Organics
Trifluoressigsäure	zur Synthese	ZChL ^a
Farbstoff	Reinheitsgrad	Hersteller
HPTA ^b	≥ 95 %	Fluka
Merocyanin 540	90 %	Aldrich
Perylen	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Rhodamin 6G		Lambda Physik
Terrylen	≥ 99 %	Kentax

^a Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes^b 8-Hydroxy-N,N,N',N',N'',N''-hexamethyl-pyrene-1,3,6-trisulfonamideTabelle A.3.: Anregungs- und Emissionswellenlängen für die Fluoreszenzspektroskopie (λ_a und λ_e) sowie Absorptions- und Emissionsmaxima (λ_{Ex}^{max} und λ_{Em}^{max}).

Farbstoff	Lösungsmittel	λ_a /nm	λ_e /nm	λ_{Ex}^{max} /nm	λ_{Em}^{max} /nm
MC540	Ethanol	532	635	560	580
HPTA	DMSO	430	630	551	566
	DMSO+TFA	430	610	430	566
Perylen	PDO	400	480	433	445
Rhodamin 6G	Glycerin	495	610	536	557
Terrylen	Nonan	510	610	552	560
	1-Octanol	515	610	555	564
	Squalen	515	610	558	566
	Toluol	500	610	560	569

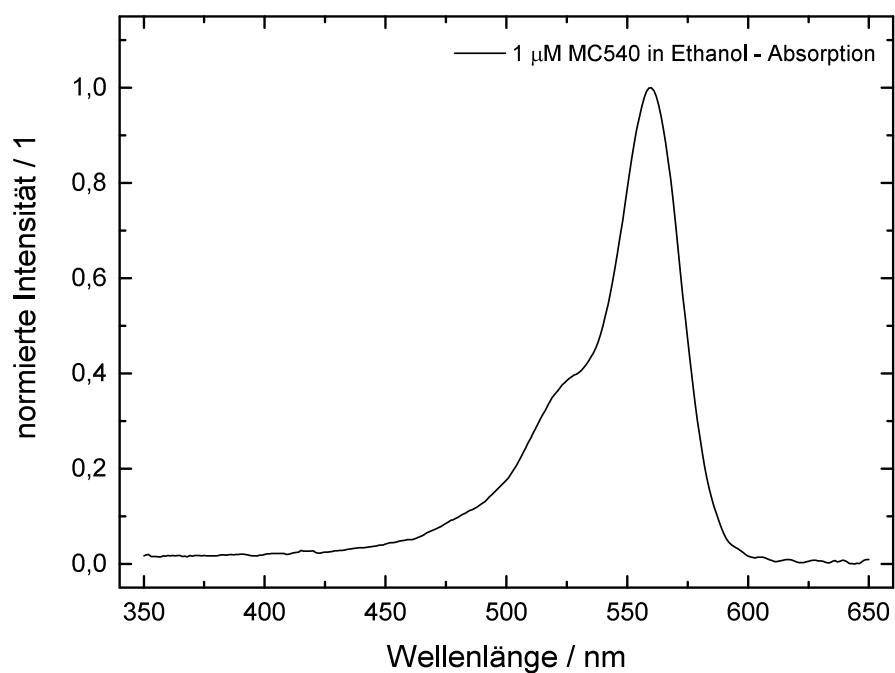


Abbildung A.2.1.: Normiertes UV-VIS-Spektrum von Merocyanin 540 in Ethanol.

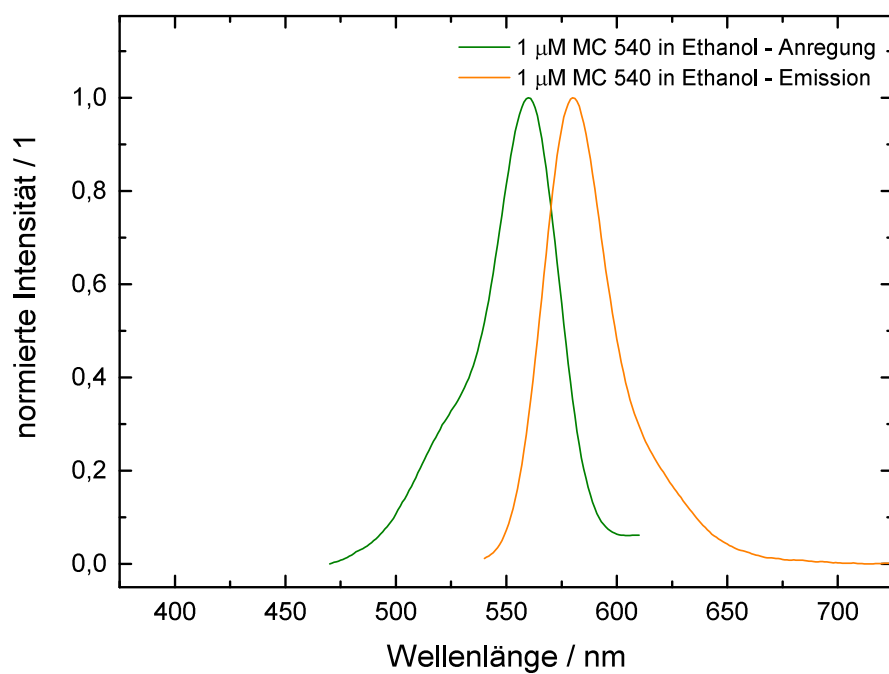


Abbildung A.2.2.: Normierte Fluoreszenzspektren von Merocyanin 540 in Ethanol.

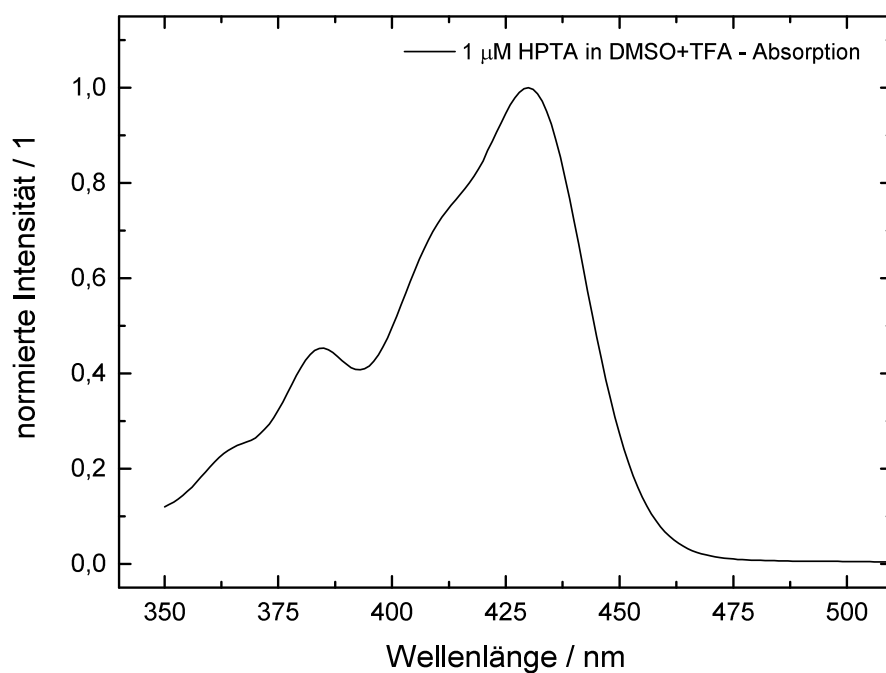


Abbildung A.2.3.: Normiertes UV-VIS-Spektrum von HPTA in TFA-saurem DMSO.

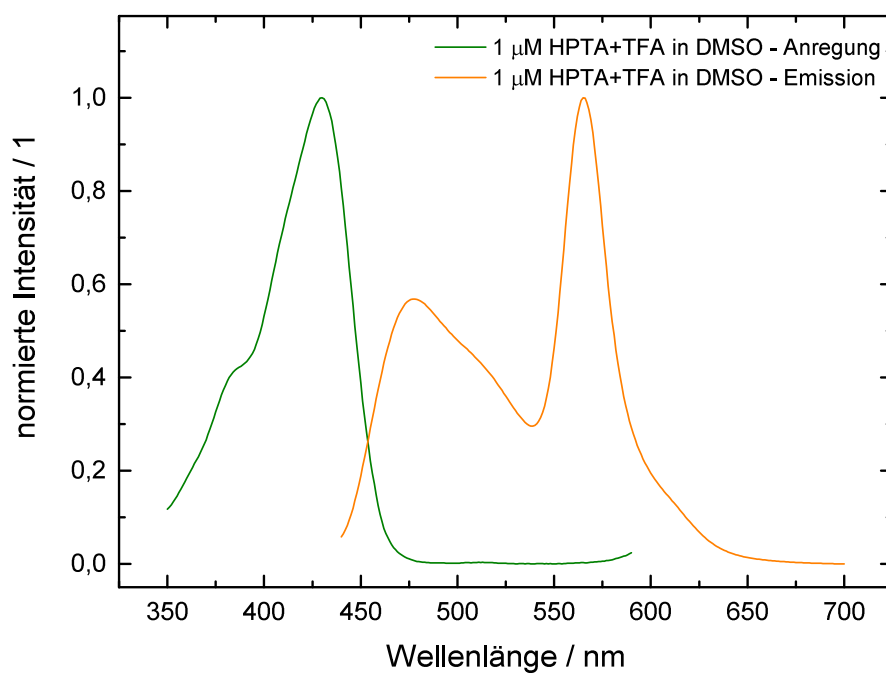


Abbildung A.2.4.: Normierte Fluoreszenzspektren von HPTA in TFA-saurem DMSO.

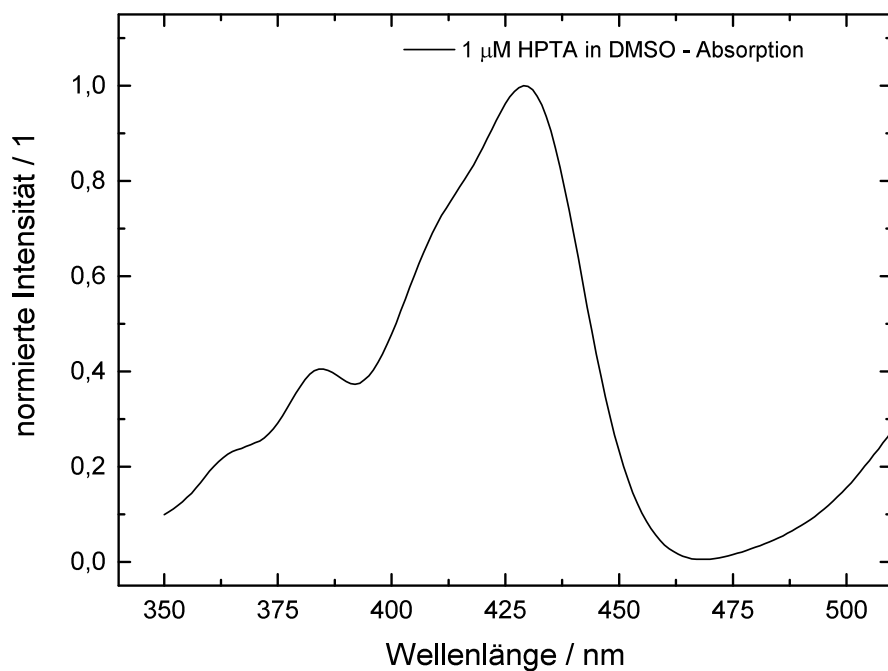


Abbildung A.2.5.: Normiertes UV-VIS-Spektrum von HPTA in DMSO.

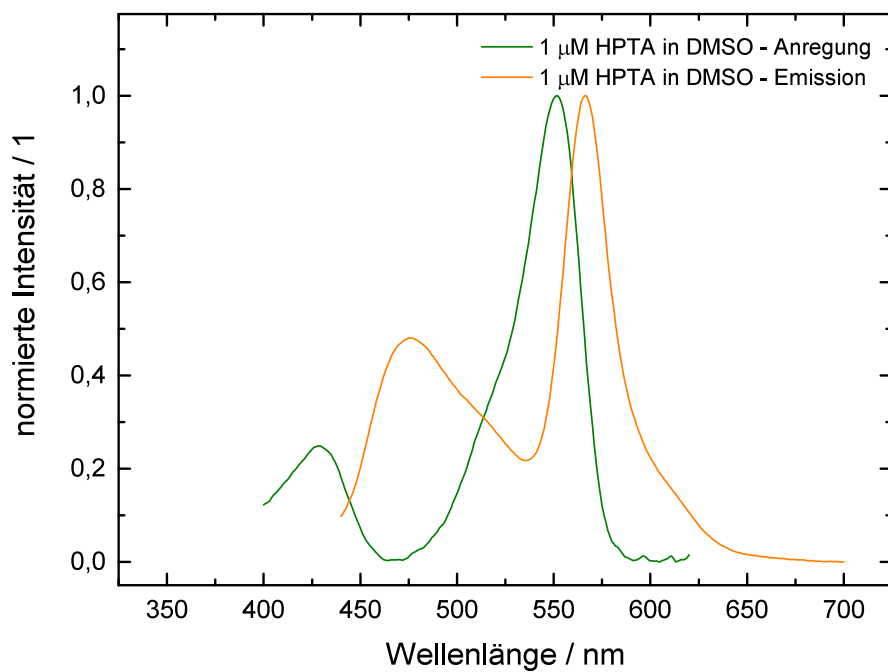


Abbildung A.2.6.: Normierte Fluoreszenzspektren von HPTA in DMSO.

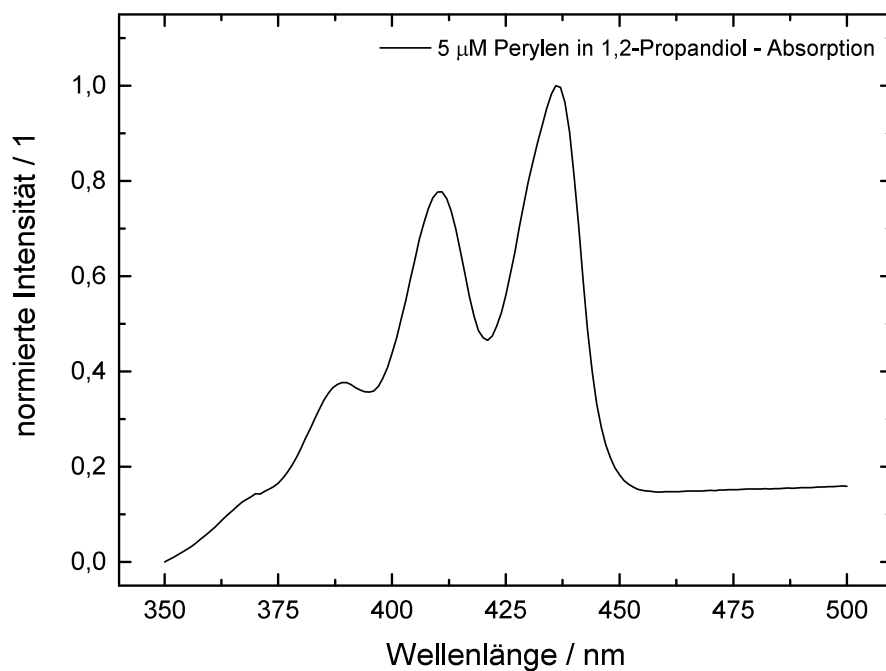


Abbildung A.2.7.: Normiertes UV-VIS-Spektrum von Perylen in 1,2-Propandiol.

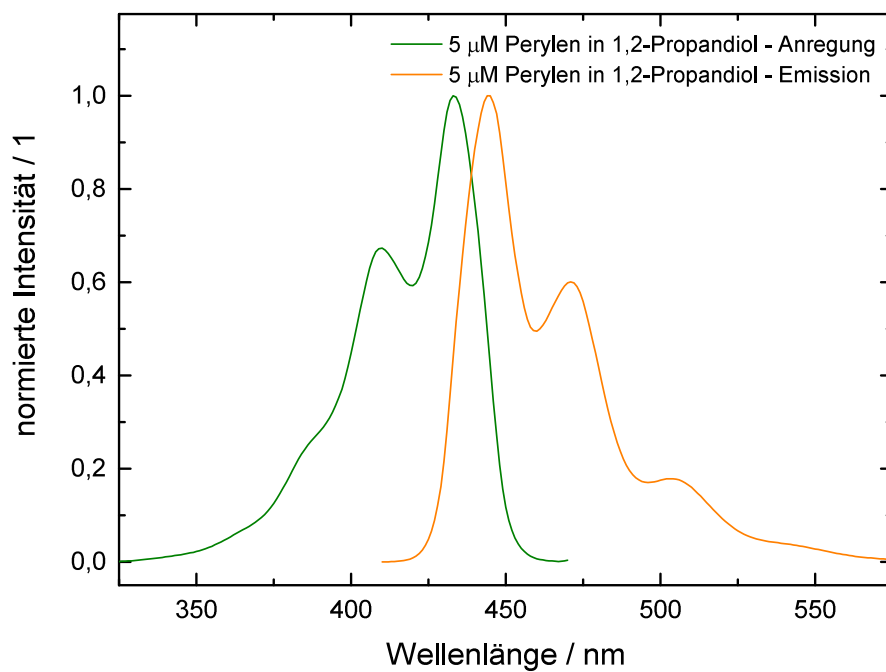


Abbildung A.2.8.: Normierte Fluoreszenzspektren von Perylen in 1,2-Propandiol.

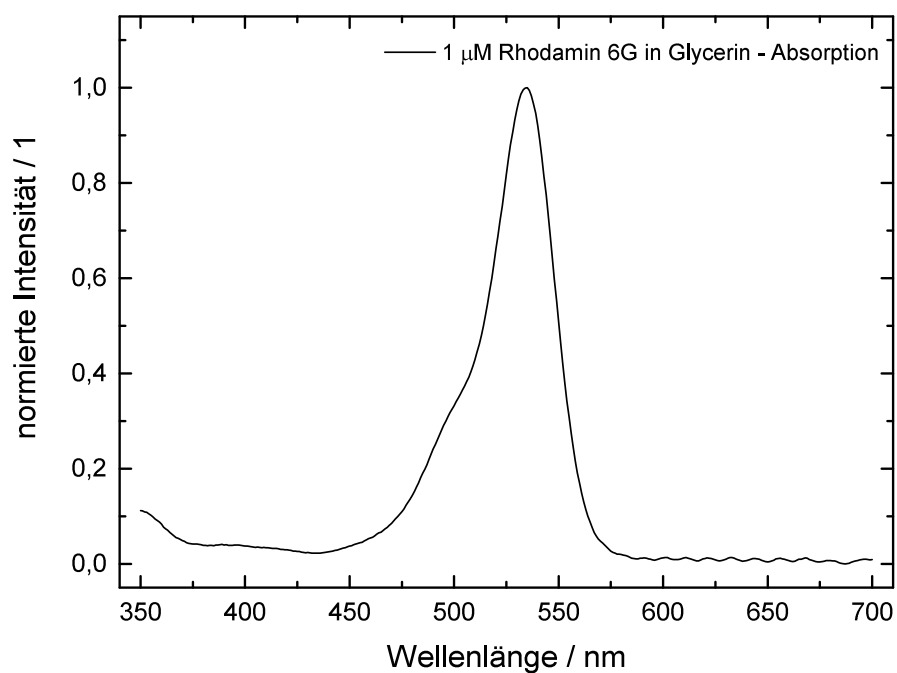


Abbildung A.2.9.: Normiertes UV-VIS-Spektrum von Rhodamin 6G in Glycerin.

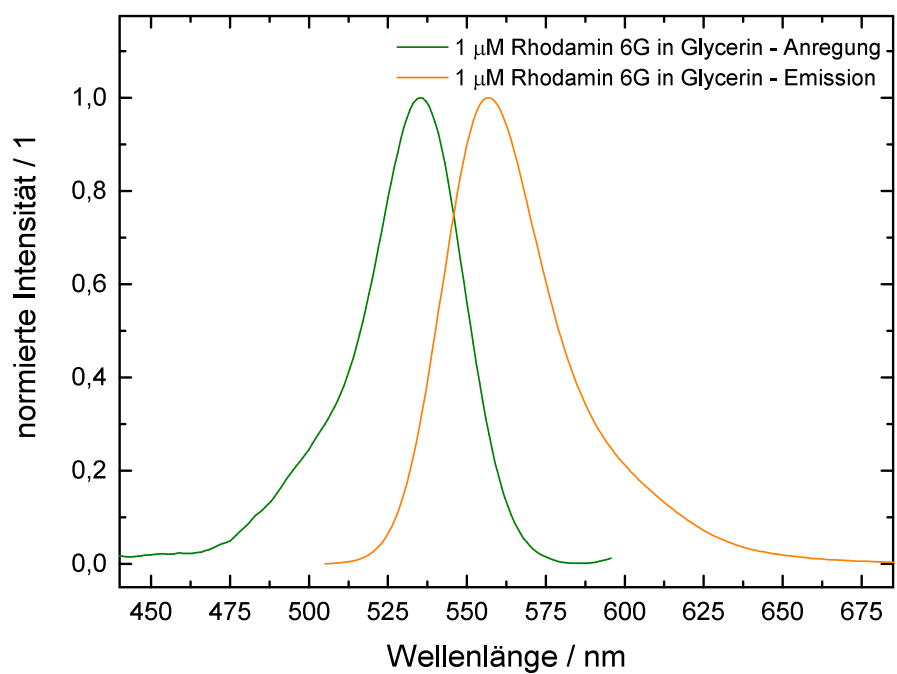


Abbildung A.2.10.: Normierte Fluoreszenzspektren von Rhodamin 6G in Glycerin.

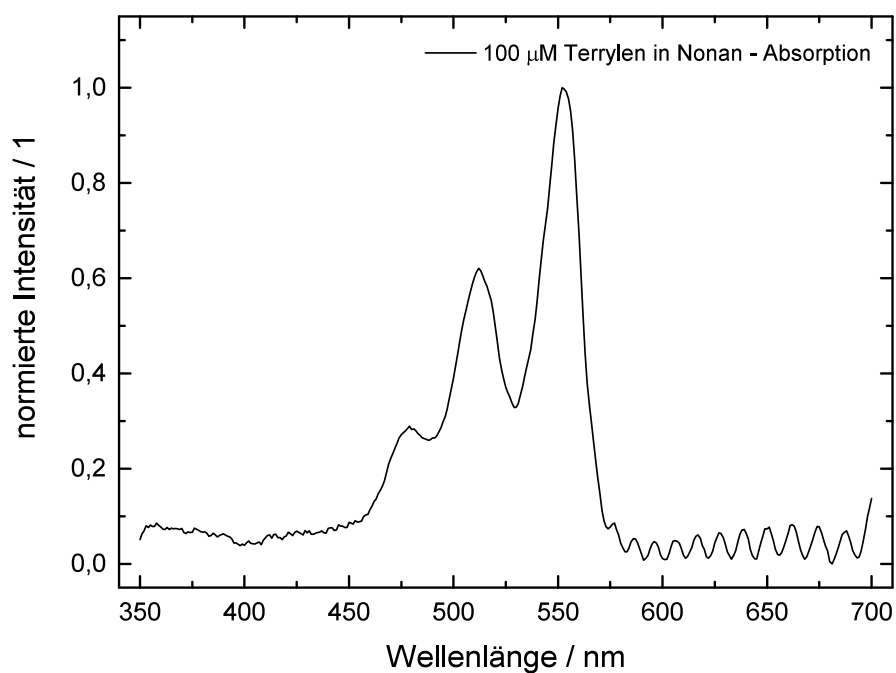


Abbildung A.2.11.: Normiertes UV-VIS-Spektrum von Terrylen in Nonan.

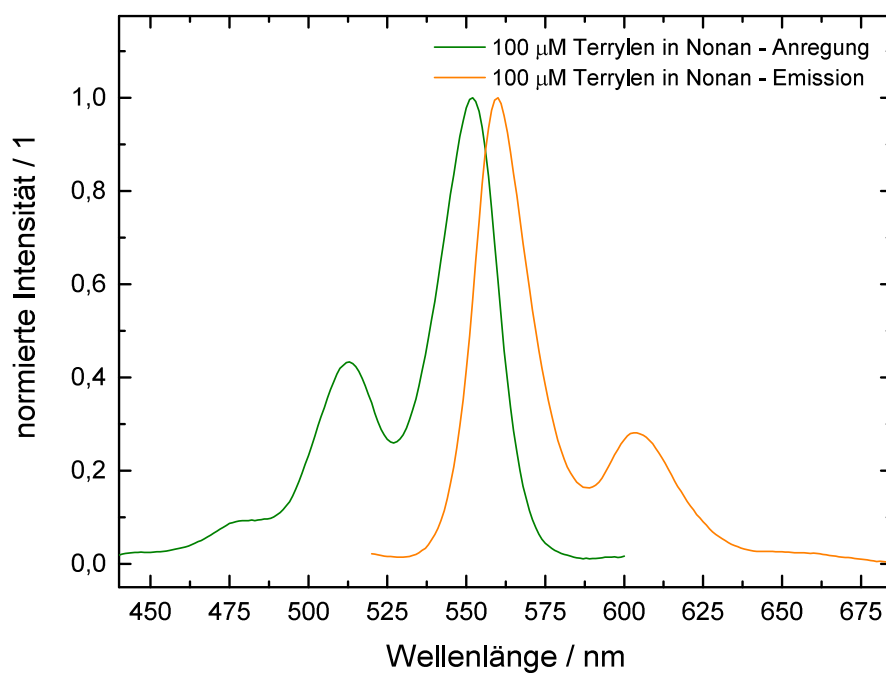


Abbildung A.2.12.: Normierte Fluoreszenzspektren von Terrylen in Nonan.

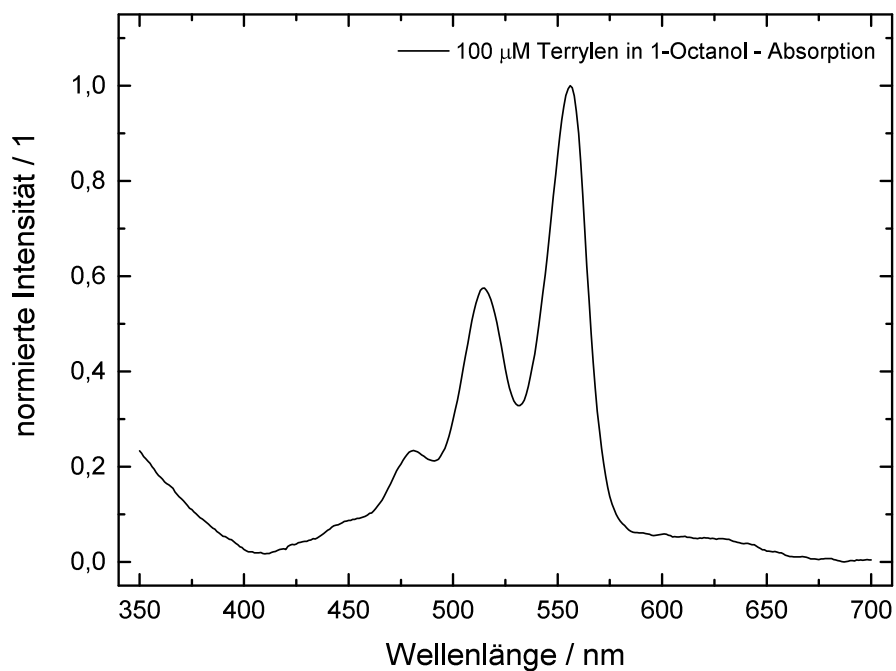


Abbildung A.2.13.: Normiertes UV-VIS-Spektrum von Terrylen in 1-Octanol.

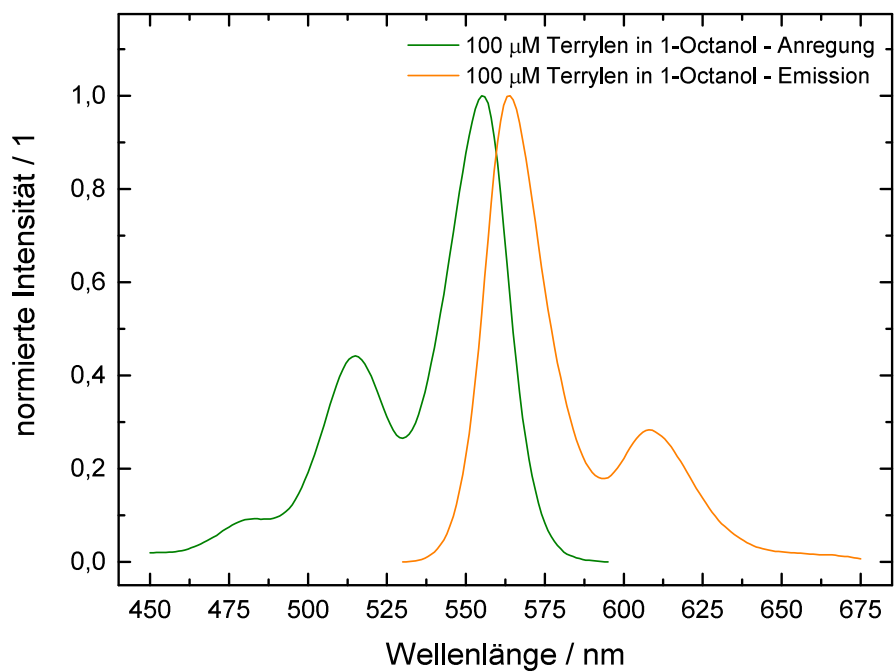


Abbildung A.2.14.: Normierte Fluoreszenzspektren von Terrylen in 1-Octanol.

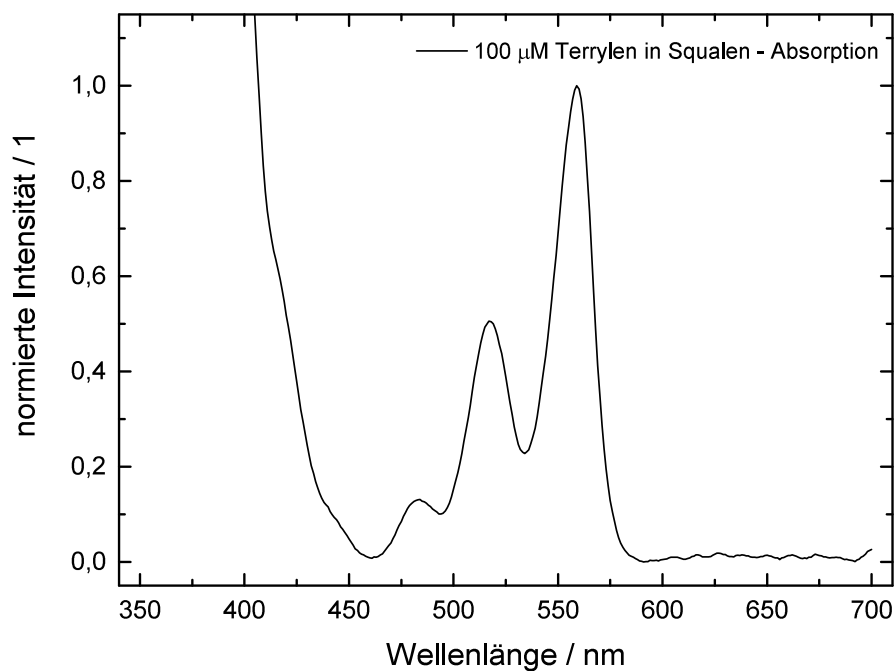


Abbildung A.2.15.: Normiertes UV-VIS-Spektrum von Terrylen in Squalen.

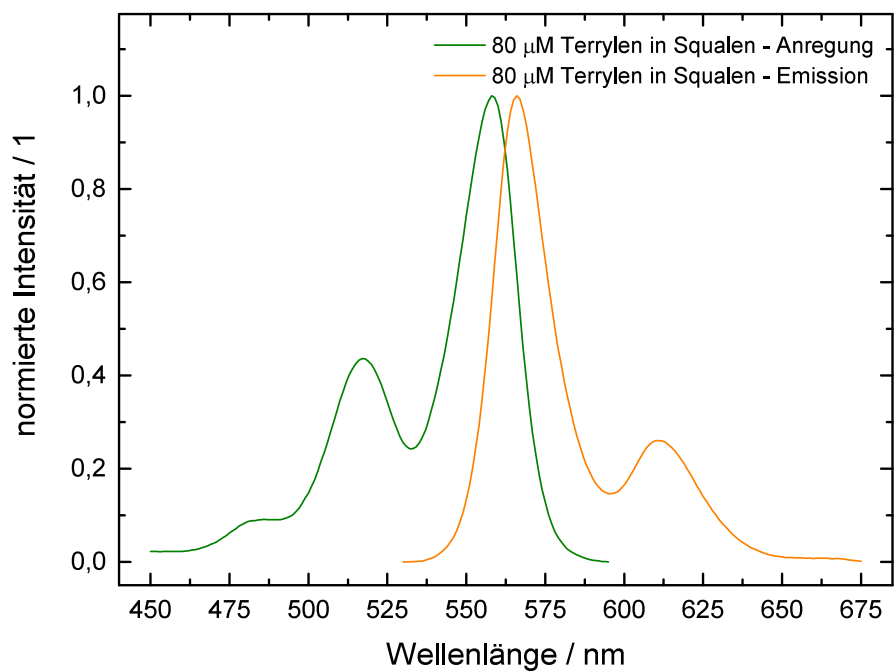


Abbildung A.2.16.: Normierte Fluoreszenzspektren von Terrylen in Squalen.

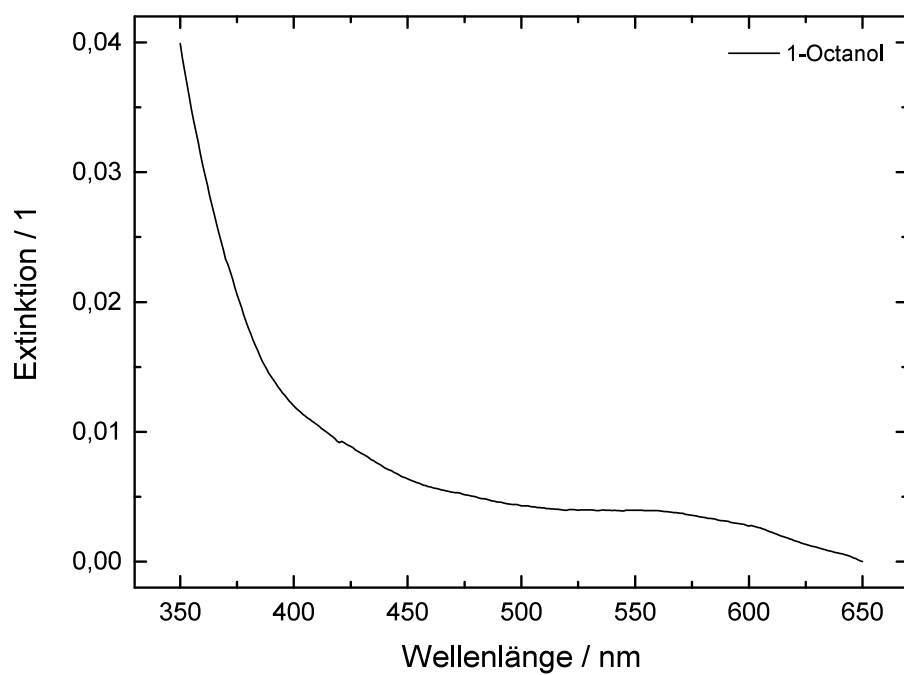


Abbildung A.2.17.: Extinktion von 1-Octanol.

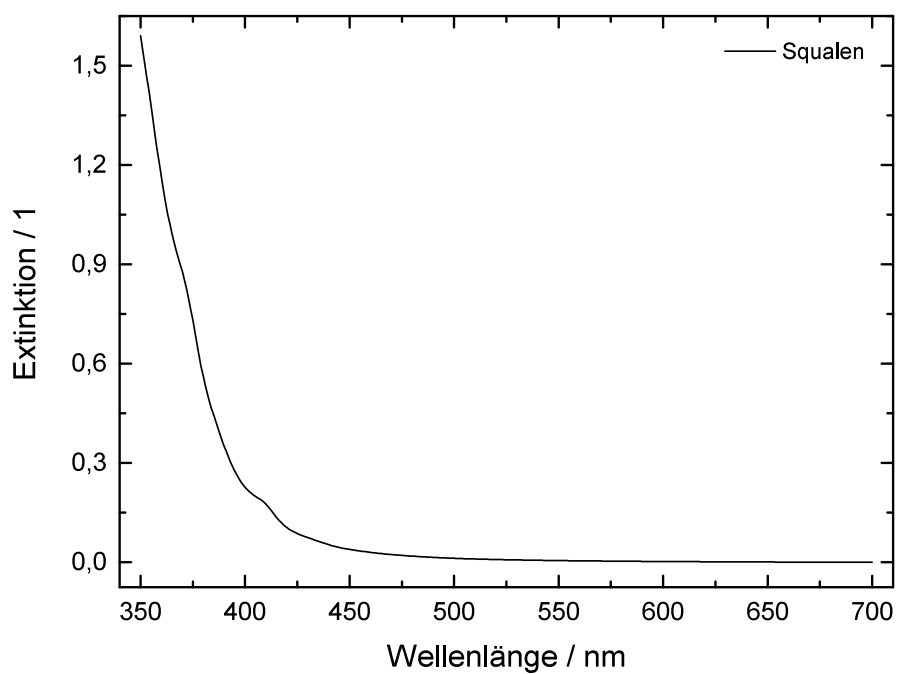


Abbildung A.2.18.: Extinktion von Squalen.

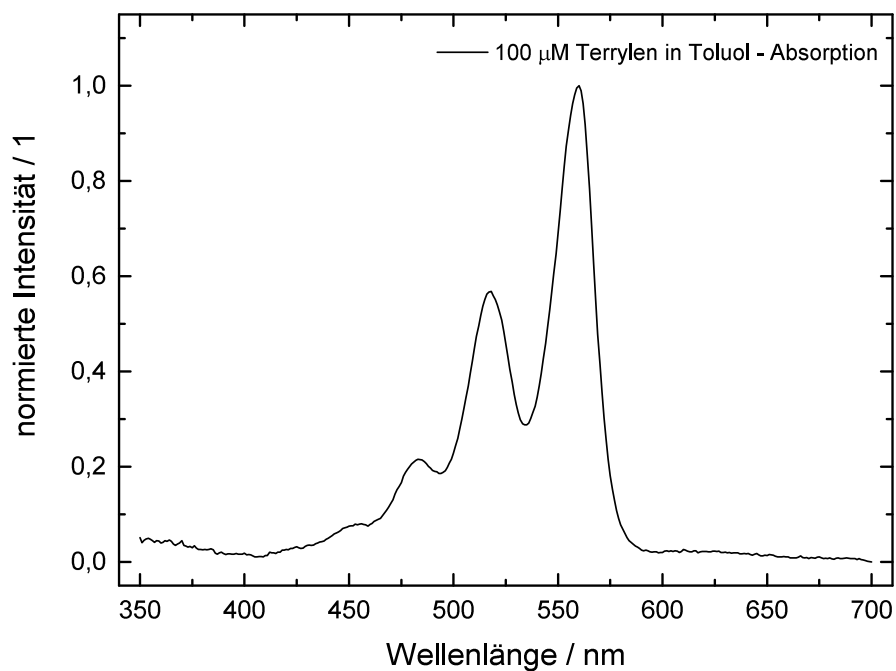


Abbildung A.2.19.: Normiertes UV-VIS-Spektrum von Terrylen in Toluol.

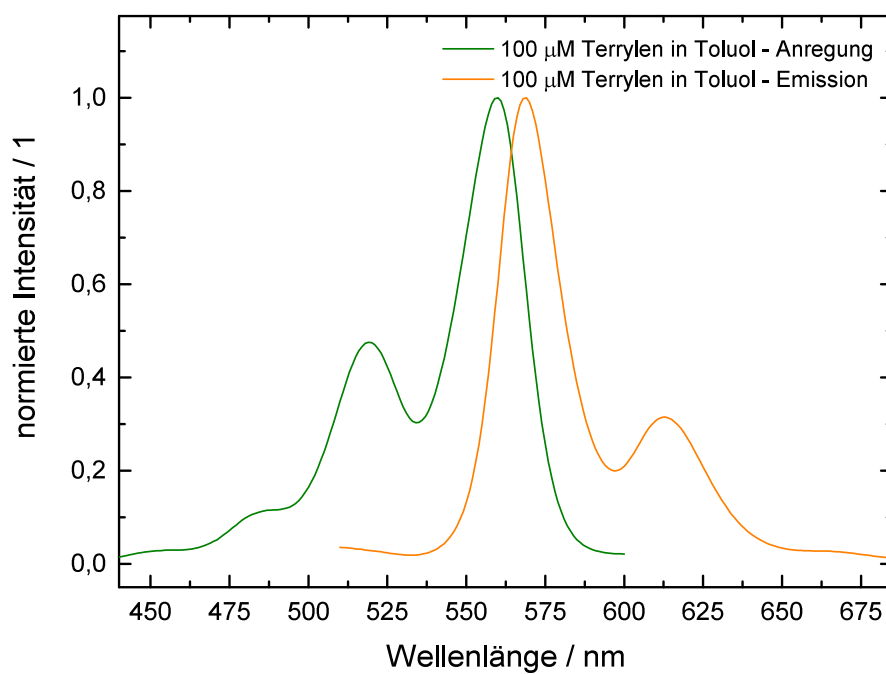


Abbildung A.2.20.: Normierte Fluoreszenzspektren von Terrylen in Toluol.

A.3. Stationäre Tieftemperaturanisotropiespektren

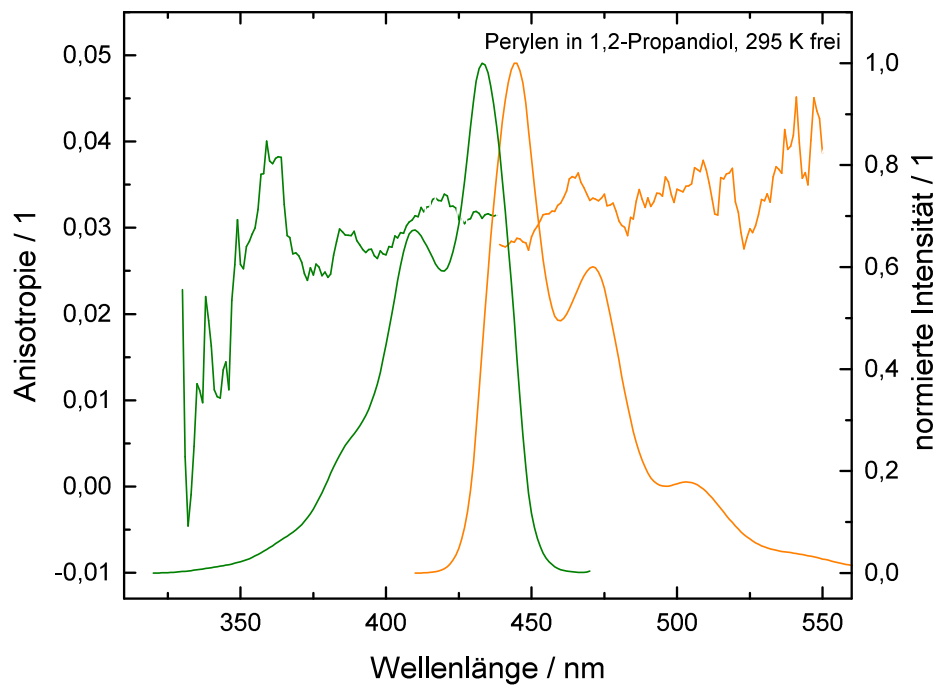


Abbildung A.3.1.: Anisotropie von Perylen in 1,2-Propandiol bei 250 K ohne Kryostat.

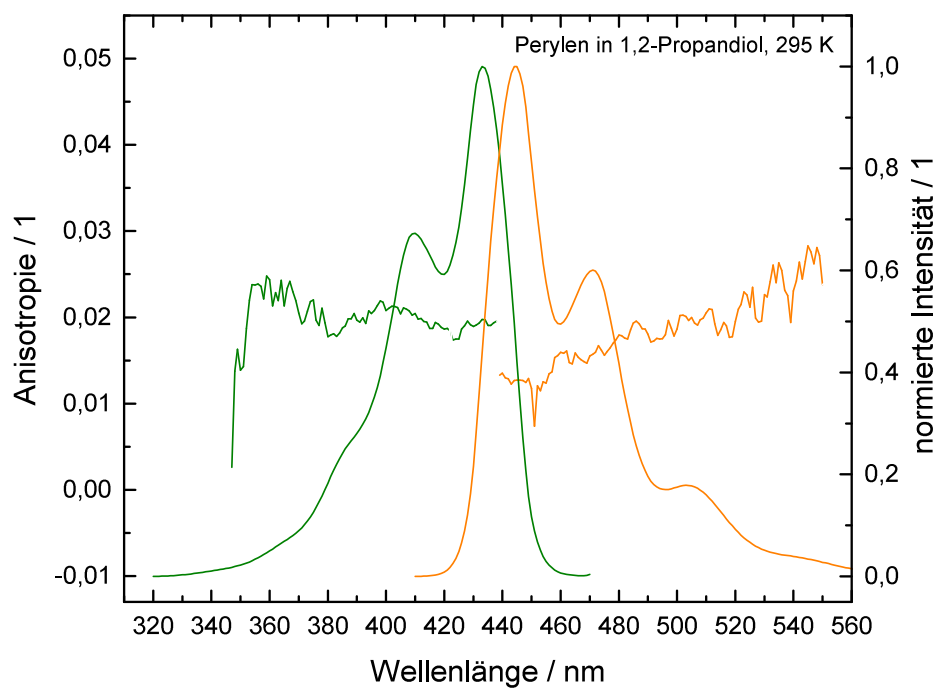


Abbildung A.3.2.: Anisotropie von Perylen in 1,2-Propandiol bei 250 K im Kryostat.

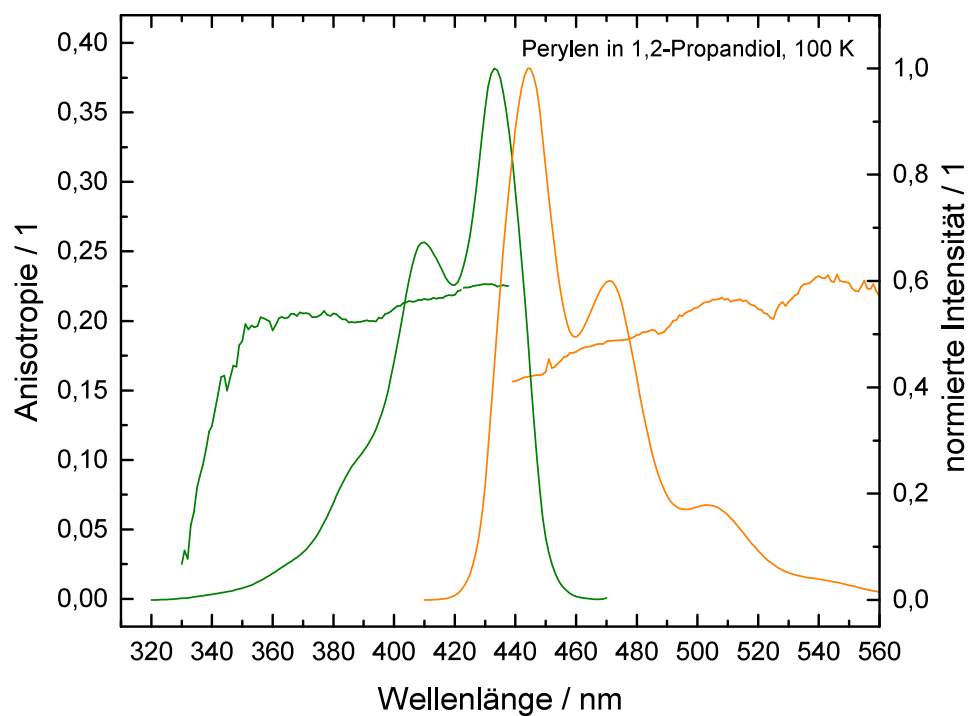


Abbildung A.3.3.: Anisotropie von Perylen in 1,2-Propandiol bei 100 K.

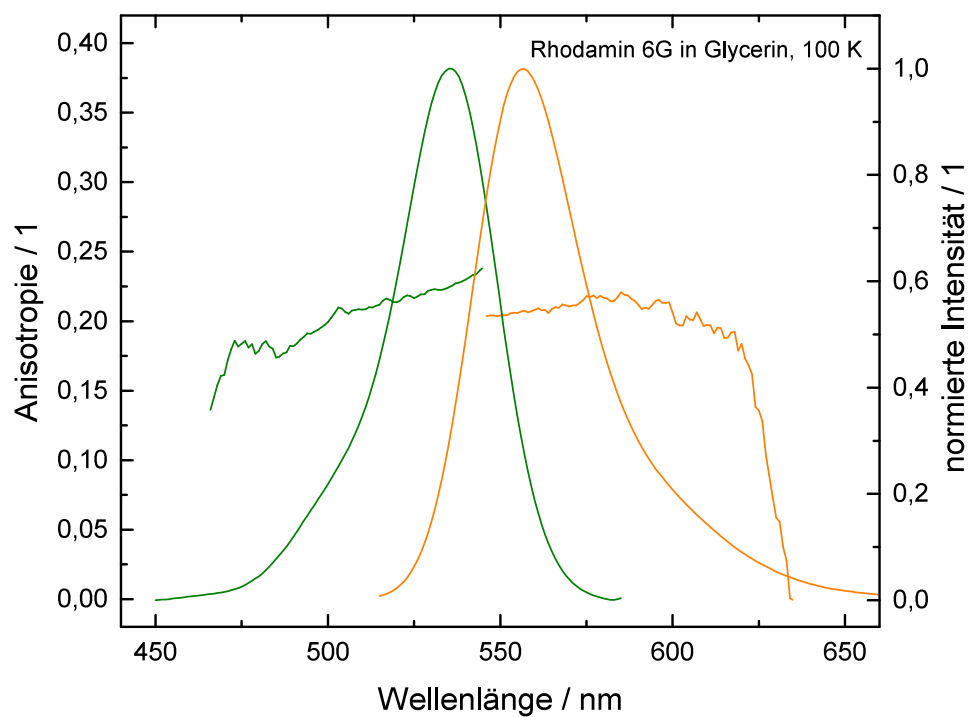


Abbildung A.3.4.: Anisotropie von Rhodamin 6G in Glycerin bei 100 K.

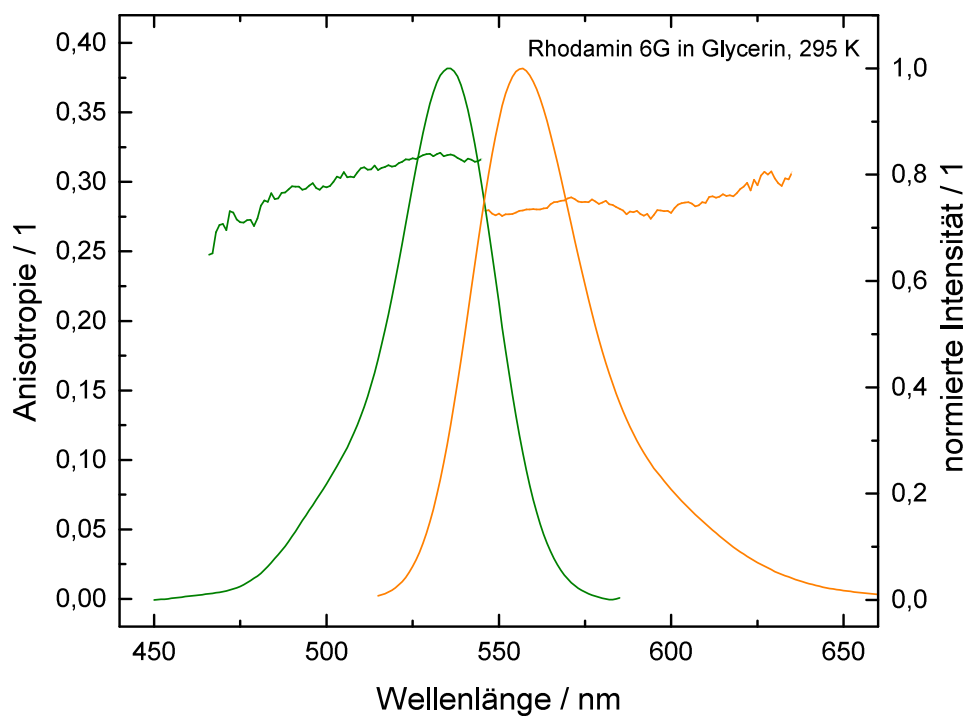


Abbildung A.3.5.: Anisotropie von Rhodamin 6G in Glycerin bei 250 K im Kryostat.

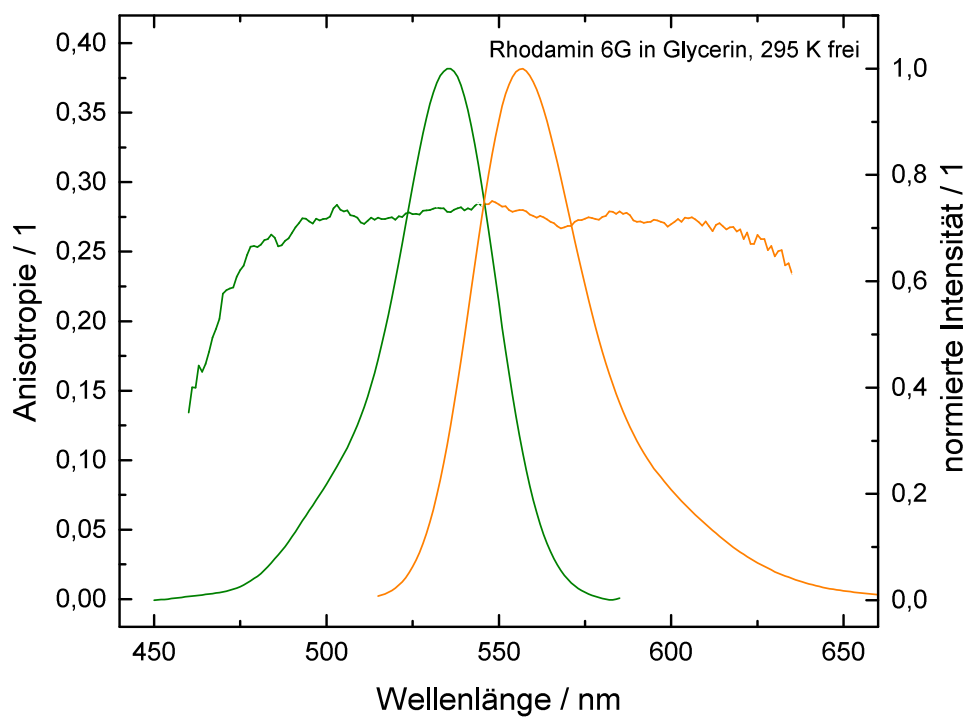


Abbildung A.3.6.: Anisotropie von Rhodamin 6G in Glycerin bei 250 K ohne Kryostat.

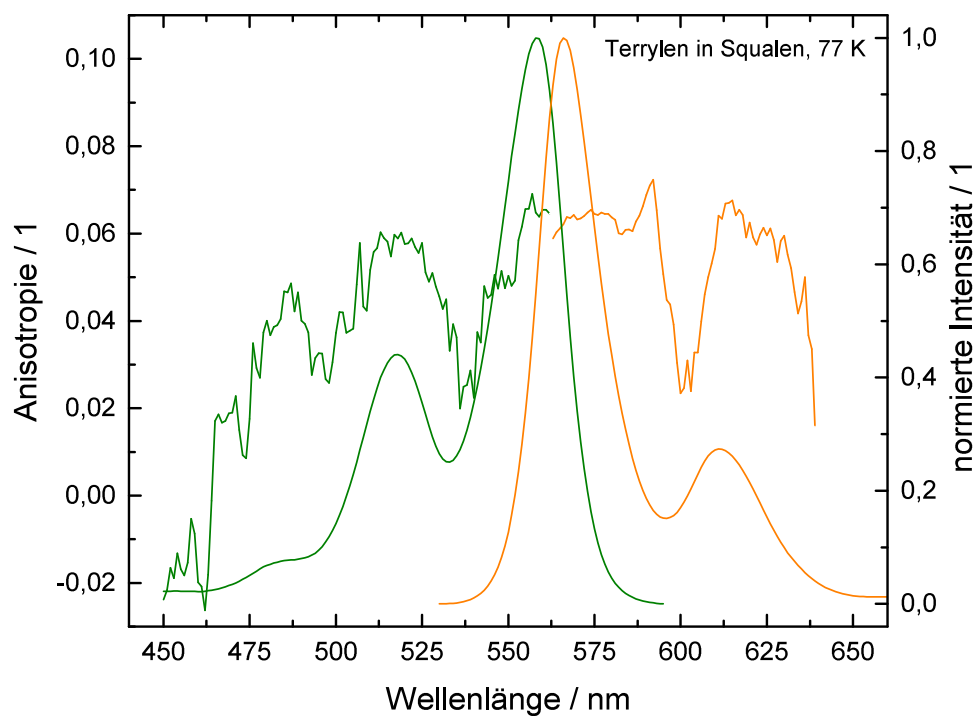


Abbildung A.3.7.: Anisotropie von Terrylen in Squalen bei 100 K.

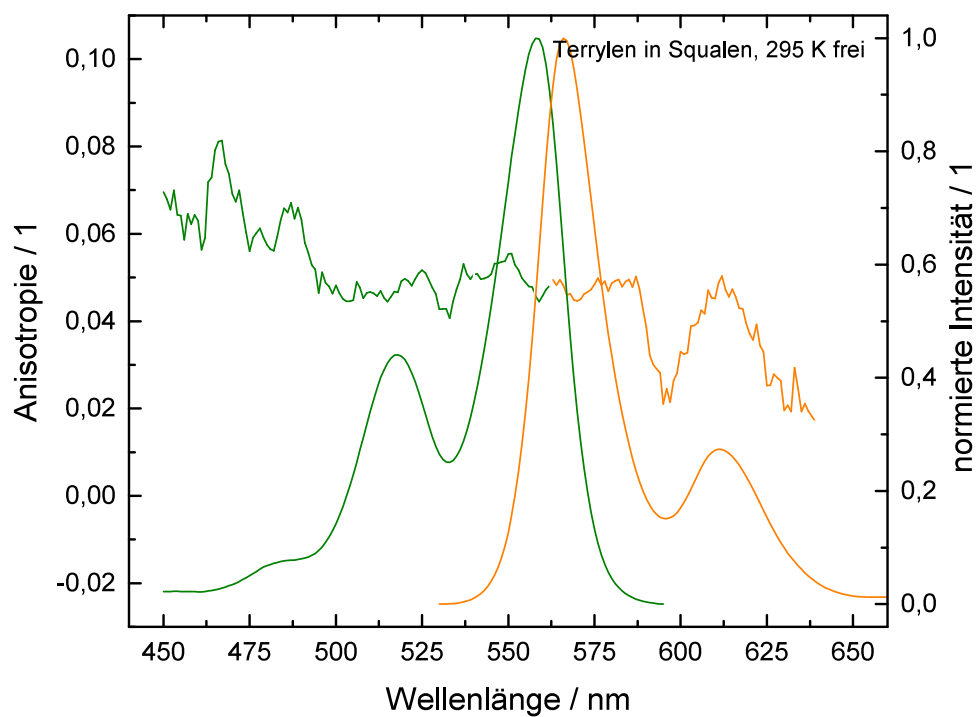


Abbildung A.3.8.: Anisotropie von Terrylen in Squalen bei 250 K ohne Kryostat.

A.4. Zeitaufgelöste Doppelresonanzspektroskopie

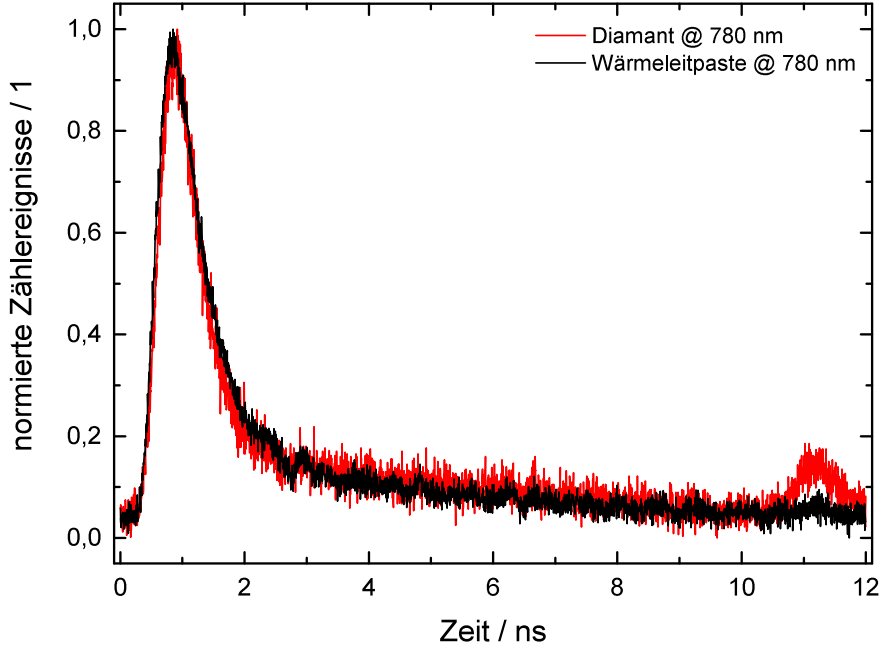


Abbildung A.4.1.: NiV-Zentren in nanokristallinen Diamantproben erzeugen keine Fluoreszenz nach Zweiphotonenanregung.

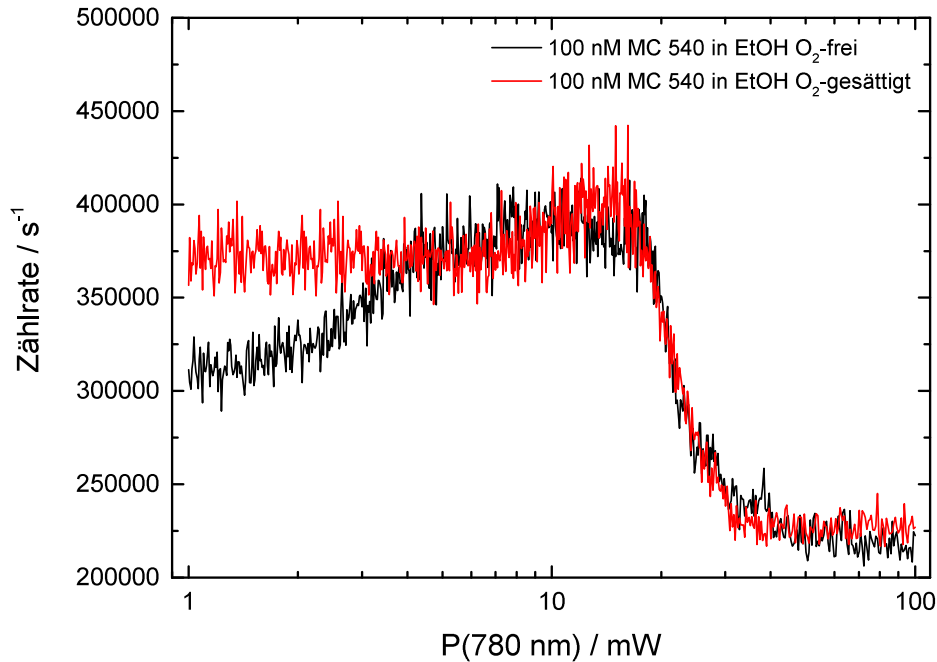


Abbildung A.4.2.: MC540 wird mit $\langle P(532 \text{ nm}) \rangle = 300 \mu\text{W}$ angeregt. Zusätzliche Anregung bei 780 nm erzeugt leistungsabhängige Effekte.

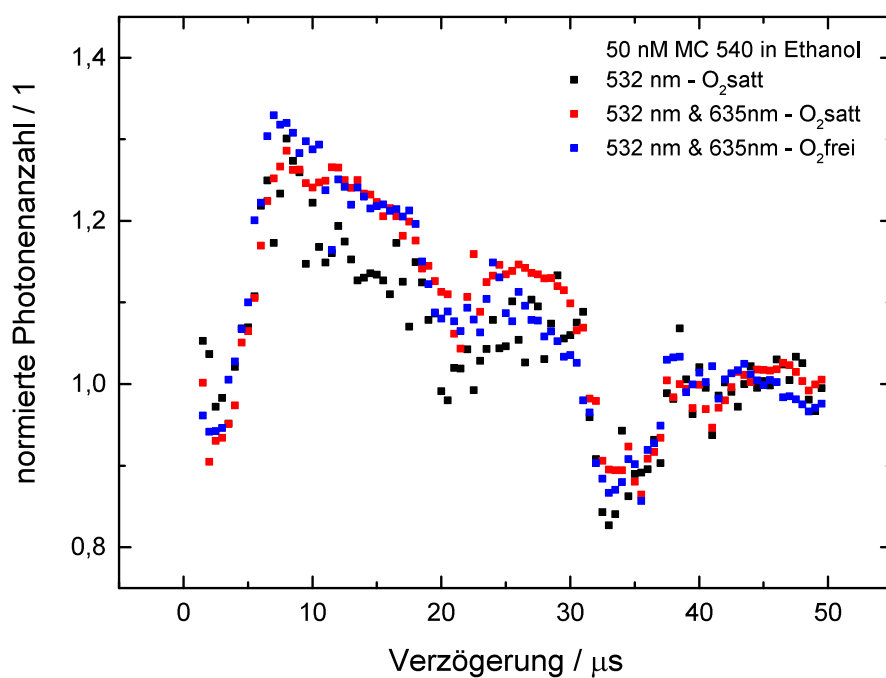


Abbildung A.4.4.: Der normierte Verlauf ist für die sauerstofffreie, die gesättigte und die nicht abgefragte Probe identisch.

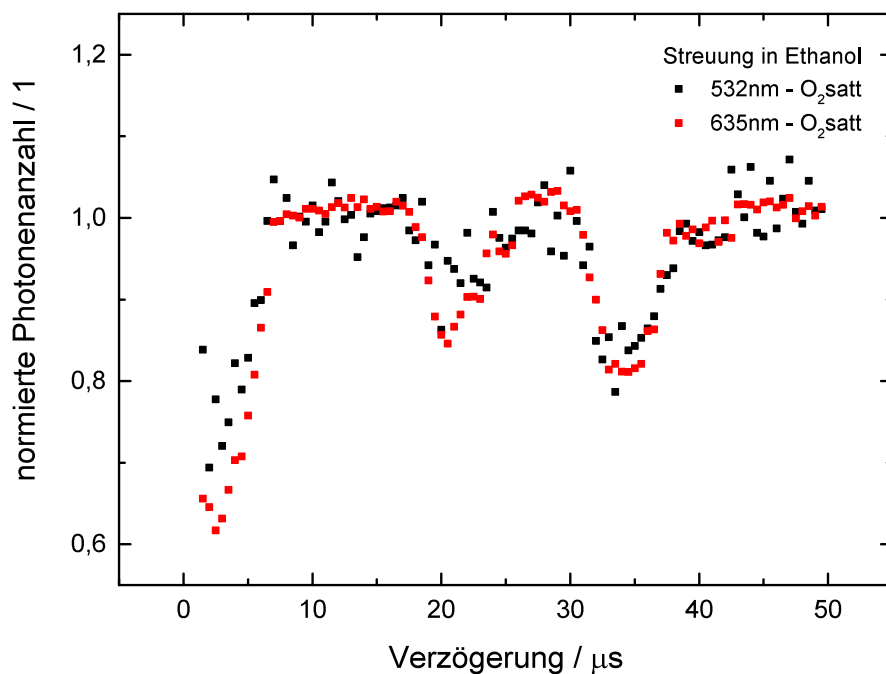


Abbildung A.4.3.: Der Zählratenrückgang ist wellenlängen- und zählratenunabhängig und somit eine Art verminderte Detektionseffizienz.

Tabelle A.4.: Parameter für die numerischen Simulationen zur Pump-Dump-Spektroskopie von MC540.

	532 nm & 780 nm
σ_e/cm^2	$2,4 \cdot 10^{-16}$ ^a
σ_s/cm^2	$3,5 \cdot 10^{-19}$
σ_{2pe}/cm^4s	$5,5 \cdot 10^{-50}$
k_{SR}/ps^{-1}	6 ^b
k_{10}/ns^{-1}	2,4 ^c
$\langle P(532\text{ nm}) \rangle /mW$	0,05
$\langle P(780\text{ nm}) \rangle /mW$	10 bis 100
τ/ps	0,1 & 0,1
t_e/ps	1
t_s/ps	0 bis 70
t_s^{opt}/ps	18
$\Delta t_{sim}/ps$	100

^a Mit dem Spektrum und $\sigma_e(515\text{ nm}) = 1,9 \cdot 10^{-16}\text{ cm}^2$. [47]

^b Zeitkonstante der „Vibrationskühlung“ [130]

^c $\tau_{S1} = 410\text{ ps}$ [41]

A.5. Zeitaufgelöste 2PE-Fluoreszenzanisotropie

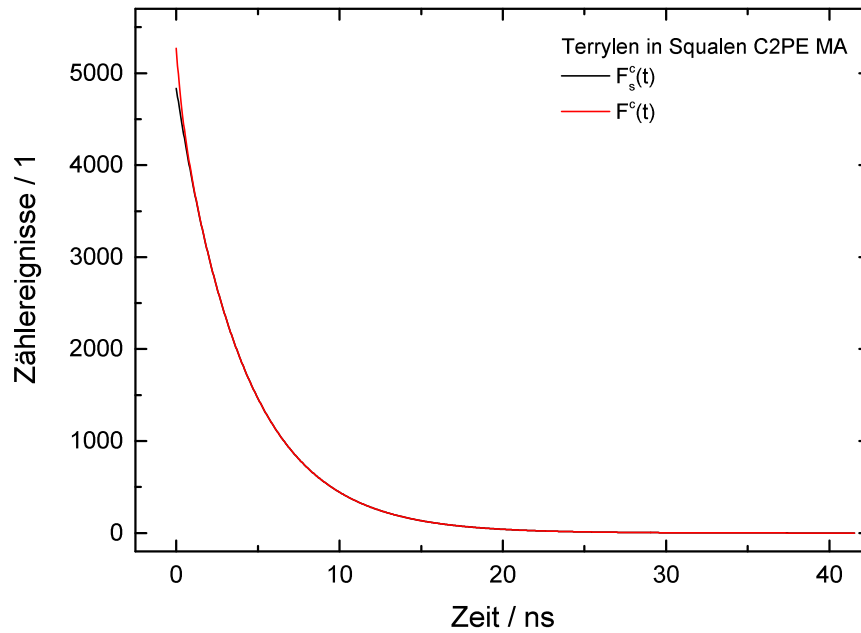


Abbildung A.5.1.: Der geringe Anteil der residuellen Anisotropie am Beispiel zirkularer 2PE.

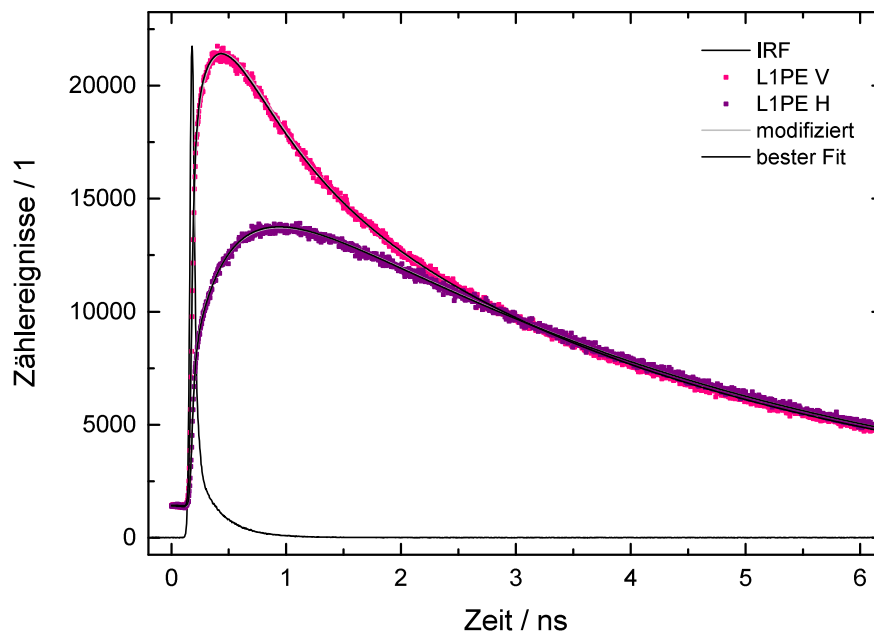


Abbildung A.5.2.: Beste und modifizierte Anpassung der 1PE-Anisotropie.

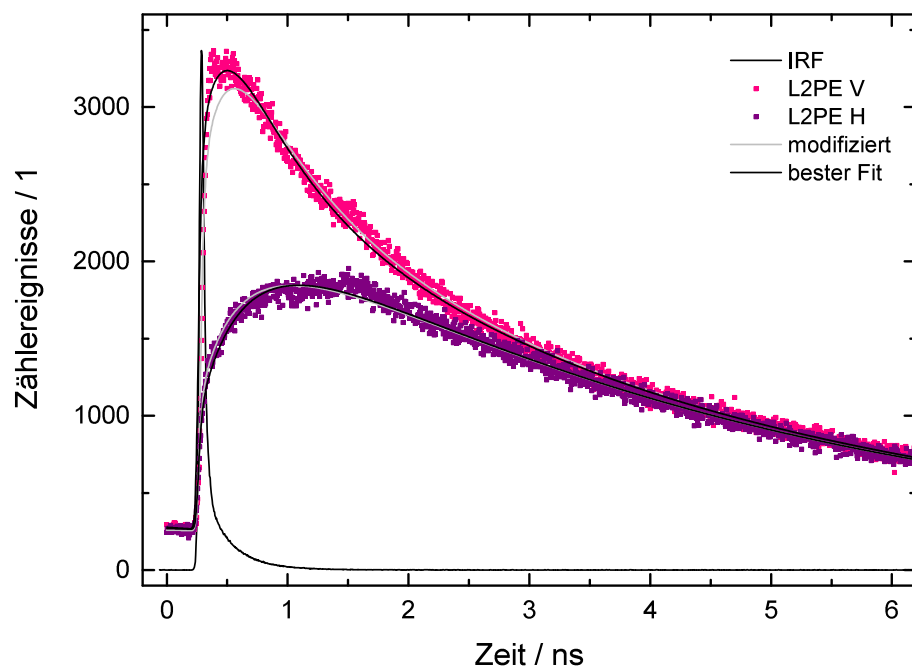


Abbildung A.5.3.: Beste und modifizierte Anpassung der linearen 2PE-Anisotropie.

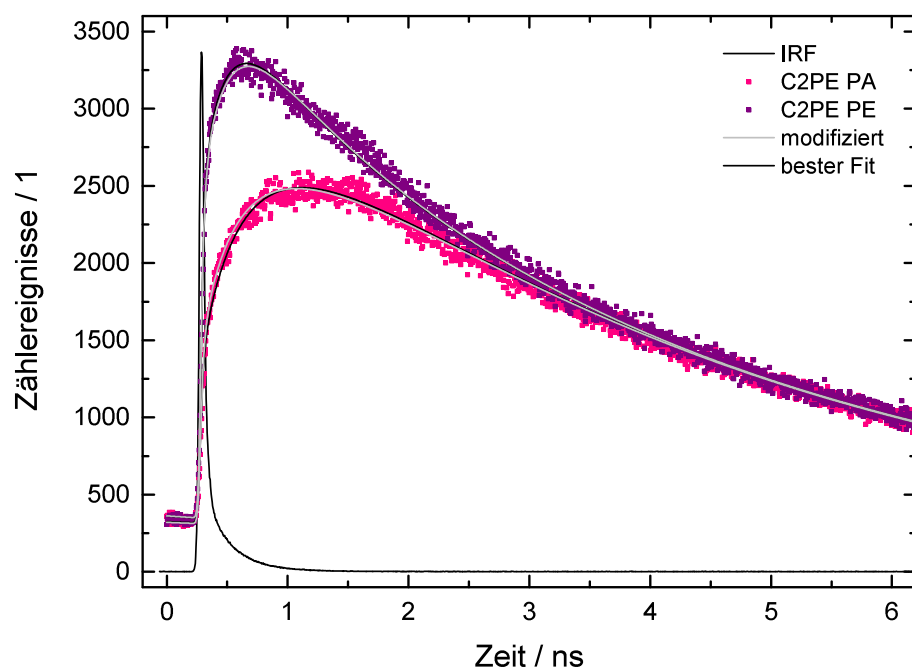


Abbildung A.5.4.: Beste und modifizierte Anpassung der zirkularen 2PE-Anisotropie.

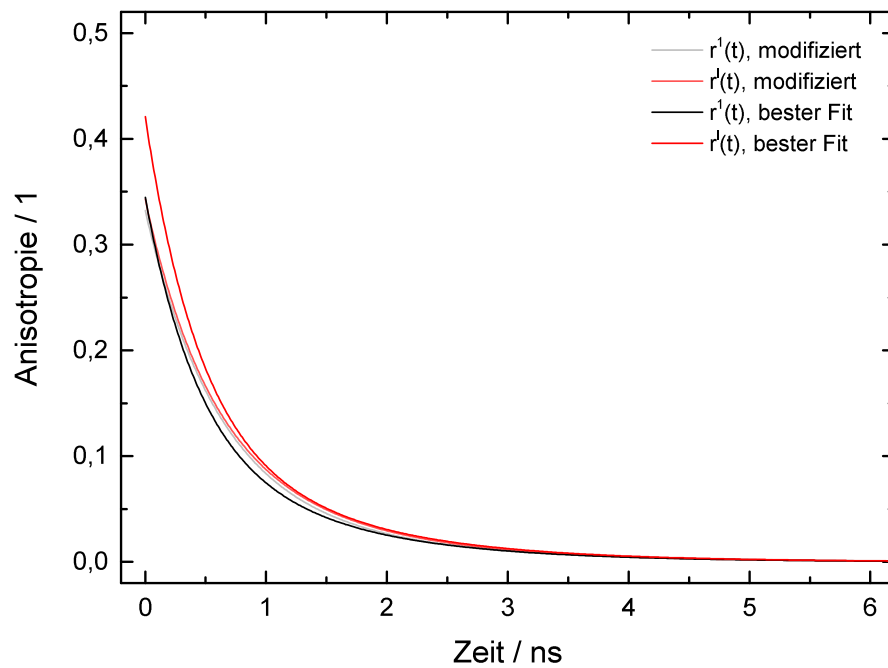


Abbildung A.5.5.: Vergleich der zeitabhängigen Anisotropie beider Anpassungen für linear polarisierte Anregung.

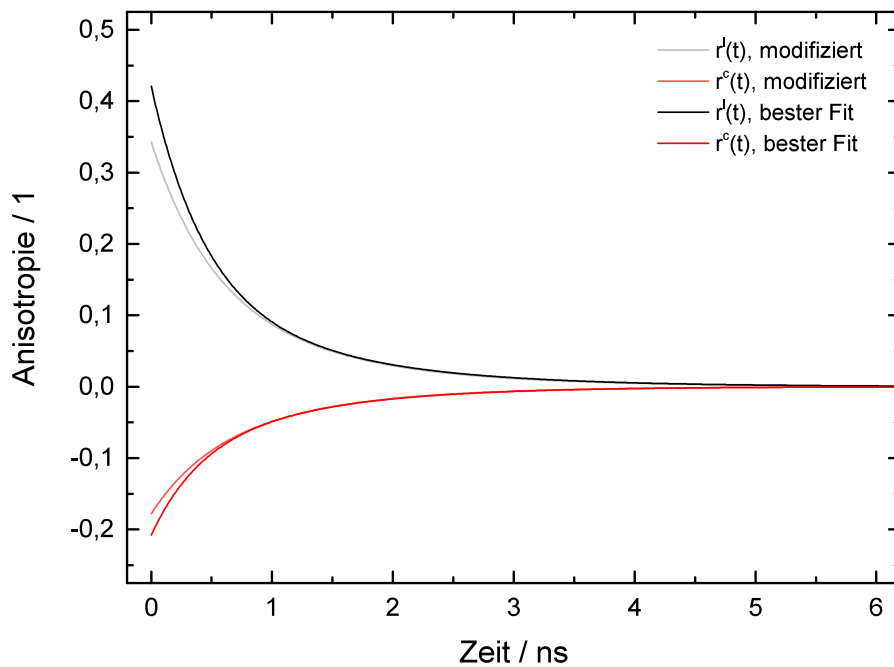


Abbildung A.5.6.: Vergleich der zeitabhängigen Anisotropie beider Anpassungen für Zwei-photonenanregung.

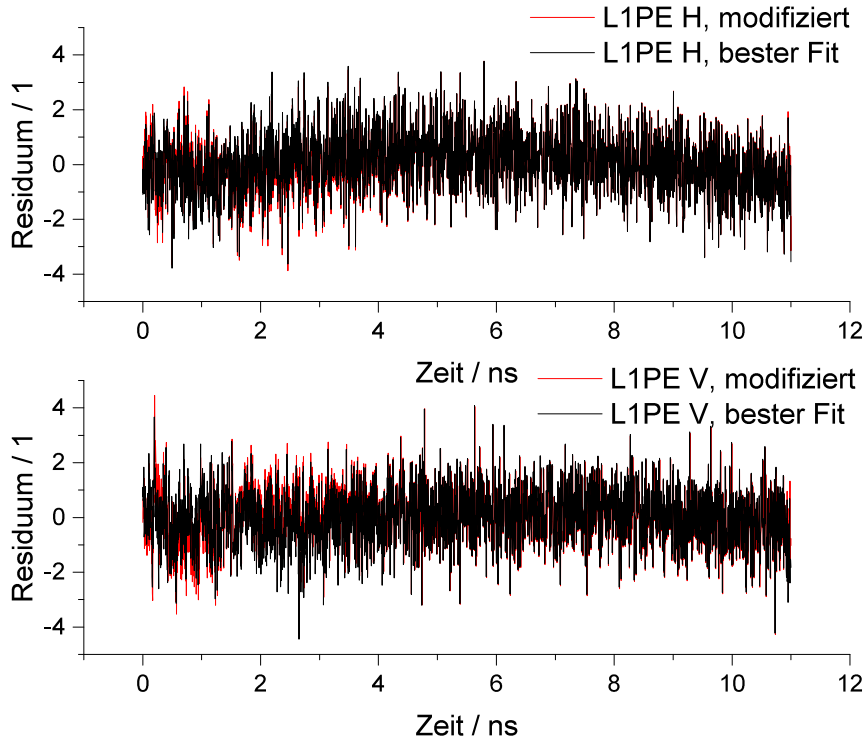


Abbildung A.5.7.: Vergleich der Residuen der Anpassungen für 1PE-Anisotropie.

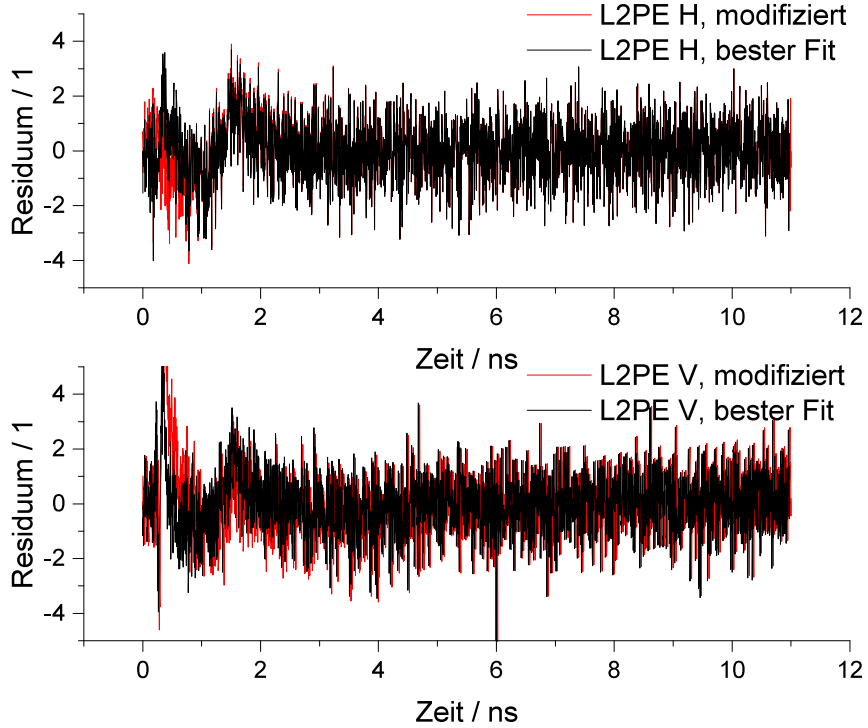


Abbildung A.5.8.: Vergleich der Residuen der Anpassungen für lineare 2PE-Anisotropie.

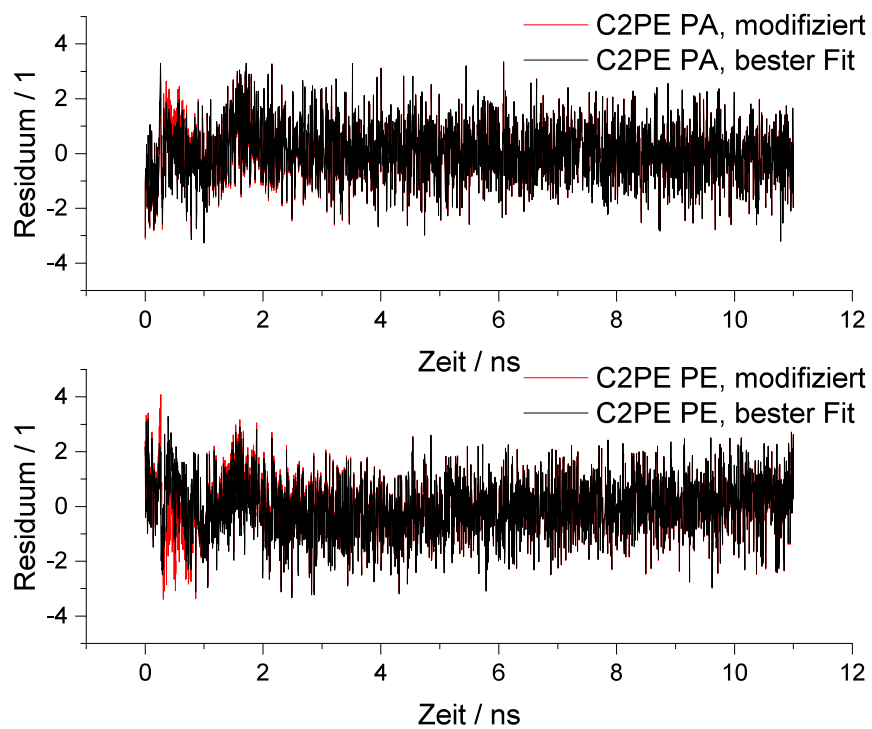


Abbildung A.5.9.: Vergleich der Residuen der Anpassungen für zirkulare 2PE-Anisotropie.

Literatur

- [1] Möckl, L., Lamb, D. C. und Bräuchle, C.: „Super-resolved Fluorescence Microscopy: Nobel Prize in Chemistry 2014 for Eric Betzig, Stefan Hell, and William E. Moerner“. In: *Angewandte Chemie International Edition* 53 (2014), S. 13972–13977.
- [2] Betzig, E. et al.: „Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution“. In: *Science* 313 (2006), S. 1642–1645.
- [3] Rust, M. J., Bates, M. und Zhuang, X.: „Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)“. In: *Nature Methods* 3 (2006), S. 793.
- [4] Hell, S. W. und Wichmann, J.: „Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy“. In: *Optics Letters* 19 (1994), S. 780–782.
- [5] Marriott, G., Clegg, R. M., Arndt-Jovin, D. J. und Jovin, T. M.: „Time resolved imaging microscopy. Phosphorescence and delayed fluorescence imaging.“ In: *Biophysical Journal* 60 (1991), S. 1374–1387.
- [6] Sandén, T., Persson, G. und Widengren, J.: „Transient State Imaging for Microenvironmental Monitoring by Laser Scanning Microscopy“. In: *Analytical Chemistry* 80 (2008), S. 9589–9596.
- [7] Spielmann, T.: „Transient State Fluorescence Microscopy - method development and biological applications “. Dissertation. KTH Stockholm, 2012.
- [8] Göppert-Mayer, M.: „Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen“. In: *Annalen der Physik* 5 (1931), S. 273–293.
- [9] Maiman, T. H.: „Stimulated Optical Radiation in Ruby“. In: *Nature* 187 (1960), S. 493–494.
- [10] Kaiser, W. und Garrett, C. B. G.: „Two-Photon Excitation in $\text{CaF}_2\text{:Eu}^{2+}$ “. In: *Physical Review Letters* 7 (1961), S. 229–231.
- [11] Friedrich, D. M. und McClain, W. M.: „Two-Photon Molecular Electronic Spectroscopy“. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 31 (1980), S. 559–577.
- [12] Callis, P. R.: „Two-Photon Induced Fluorescence“. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 48 (1997), S. 271–291.
- [13] Diaspro, A., Chirico, G. und Collini, M.: „Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy“. In: *Quarterly Reviews of Biophysics* 38 (2005), S. 97–166.

- [14] Lakowicz, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. Aufl. Springer, 2006.
- [15] Callis, P. R.: „The Theory of Two-Photon-Induced Fluorescence Anisotropy“. In: *Topics in Fluorescence Spectroscopy; Volume 5: Nonlinear and Two-Photon-Induced Fluorescence*. Hrsg. von Lakowicz, J. Plenum Press, 1997, S. 1–42.
- [16] Johnson, C. K. und Wan, C.: „Anisotropy Decays Induced by Two-Photon Excitation“. In: *Topics in Fluorescence Spectroscopy; Volume 5: Nonlinear and Two-Photon-Induced Fluorescence*. Hrsg. von Lakowicz, J. Plenum Press, 1997, S. 43–85.
- [17] Opanasyuk, O., Ryderfors, L., Mukhtar, E. und Johansson, L. B.-A.: „Two-photon excited fluorescence depolarisation and electronic energy migration within donor-donor pairs“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 11 (2009), 7152–7160.
- [18] Leeder, J. M. und Andrews, D. L.: „A molecular theory for two-photon and three-photon fluorescence polarization“. In: *The Journal of Chemical Physics* 134, 094503 (2011), S. 094503.
- [19] Herbrich, S. et al.: „Two-color two-photon excited fluorescence of indole: Determination of wavelength-dependent molecular parameters“. In: *The Journal of Chemical Physics* 142, 024310 (2015).
- [20] Ryderfors, L., Mukhtar, E. und Johansson, L.: „Two-photon excited fluorescence depolarisation experiments: II. The proper response function for analysing TCSPC data“. In: *Chemical Physics Letters* 411 (2005), 51–60.
- [21] Ryderfors, L., Mukhtar, E. und Johansson, L. B.-A.: „Two-photon excited fluorescence and molecular reorientations in liquid solutions“. In: *Journal of Fluorescence* 17 (2007), 466–480.
- [22] Ryderfors, L., Mukhtar, E. und Johansson, L. B.-A.: „The symmetry of two-photon excited states as determined by time-resolved fluorescence depolarization experiments“. In: *Journal of Physical Chemistry A* 111 (2007), 11531–11539.
- [23] Ryderfors, L., Mukhtar, E. und Johansson, L. B.-A.: „Excited-state symmetry and reorientation dynamics of perylenes in liquid solutions: Time-resolved fluorescence depolarization studies using one- and two-photon excitation“. In: *Journal of Physical Chemistry A* 112 (2008), 5794–5803.
- [24] Sauer, M., Hofkens, J. und Enderlein, J.: *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Single Molecules to Ensembles*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2011.
- [25] Kasha, M.: „Characterization of electronic transitions in complex molecules“. In: *Discussions of the Faraday Society* 9 (1950), S. 14–19.
- [26] Choi, C. L. et al.: „Spatially Indirect Emission in a Luminescent Nanocrystal Molecule“. In: *Nano Letters* 11 (2011), S. 2358–2362.

-
- [27] Bixon, M. und Jortner, J.: „Intramolecular Radiationless Transitions“. In: *The Journal of Chemical Physics* 48 (1968), S. 715–726.
- [28] Demtröder, W.: *Laserspektroskopie 2 – Experimentelle Techniken*. 6. Aufl. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013.
- [29] Mohammed, O. F., Xiao, D., Batista, V. S. und Nibbering, E. T. J.: „Excited-State Intramolecular Hydrogen Transfer (ESIHT) of 1,8-Dihydroxy-9,10-anthraquinone (DHAQ) Characterized by Ultrafast Electronic and Vibrational Spectroscopy and Computational Modeling“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 118 (2014), S. 3090–3099.
- [30] Simkovitch, R. et al.: „Comprehensive Study of Ultrafast Excited-State Proton Transfer in Water and D2O Providing the Missing RO···H+ Ion-Pair Fingerprint“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 118 (2014), S. 4425–4443.
- [31] Ertmer, W. und Hofer, B.: „Zero-field hyperfine structure measurements of the metastable states $3d^2 4s\ ^4F_{3/2,9/2}$ of $^{4,5}Sc$ using laser-fluorescence atomic-beam-magnetic-resonance technique“. In: *Zeitschrift für Physik A Atoms and Nuclei* 276 (1976), S. 9–14.
- [32] Moerner, W. E., Hrsg.: *Persistent Spectral Hole-Burning: Science and Applications*. Topics in Current Physics. Springer-Verlag, 1988.
- [33] Schmidt, T., Macfarlane, R. M. und Völker, S.: „Persistent and transient spectral hole burning in Pr^{3+} - and Eu^{3+} -doped silicate glasses“. In: *Physical Review B* 50 (1994), S. 15707.
- [34] Purchase, R. und Völker, S.: „Spectral hole burning: examples from photosynthesis“. In: *Photosynthesis Research* 101 (2009), S. 245–266.
- [35] Gehrig, D. W. et al.: „Efficiency-Limiting Processes in Low-Bandgap Polymer: Perylene Diimide Photovoltaic Blends“. In: *The Journal of Physical Chemistry C* 118 (2014), S. 20077–20085.
- [36] Imanbaew, D. et al.: „Excited-state dynamics of a ruthenium(II) catalyst studied by transient photofragmentation in gas phase and transient absorption in solution“. In: *Chemical Physics* 442 (2014), S. 53–61.
- [37] Neupane, B., Ligler, F. S. und Wang, G.: „Review of recent developments in stimulated emission depletion microscopy: applications on cell imaging“. In: *Journal of Biomedical Optics* 19 (2014), S. 080901.
- [38] Kumpulainen, T., Lang, B., Rosspeintner, A. und Vauthey, E.: „Ultrafast Elementary Photochemical Processes of Organic Molecules in Liquid Solution“. In: *Chemical Reviews* 117 (2017), S. 10826–10939.

- [39] Gottlieb, S. M. et al.: „Optically Guided Photoactivity: Coordinating Tautomerization, Photoisomerization, Inhomogeneity, and Reactive Intermediates within the RcaE Cyanobacteriochrome“. In: *The Journal of Physical Chemistry Letters* 5 (2014), S. 1527–1533.
- [40] Niedre, M., Patterson, M. S. und Wilson, B. C.: „Direct Near-infrared Luminescence Detection of Singlet Oxygen Generated by Photodynamic Therapy in Cells In Vitro and Tissues In Vivo“. In: *Photochemistry and Photobiology* 75 (2002), S. 382–391.
- [41] Benniston, A. C. und Harriman, A.: „Photoisomerization of a sterically constrained merocyanine dye“. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 94 (1998), S. 1841–1847.
- [42] Becker, W.: *The bh TCSPC Handbook*. 7. Aufl. Becker & Hickl GmbH, 2017.
- [43] Seneta, E.: „A Tricentenary history of the Law of Large Numbers“. In: *Bernoulli* 19 (2013), S. 1088–1121.
- [44] Staut, T.: „Aufbau eines Zwei-Photonen-Spektrometers zur Charakterisierung von Farbstoffen“. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes, 2012.
- [45] Plato, R.: *Numerische Mathematik kompakt*. Friedrich Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, 2000.
- [46] Klar, T. A.: „Progress in Stimulated Emission Depletion Microscopy“. Dissertation. Universität Heidelberg, 2001.
- [47] Widengren, J. und Seidel, C. A. M.: „Manipulation and characterization of photo-induced transient states of Merocyanine 540 by fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 2 (2000), S. 3435–3441.
- [48] Widengren, J., Mets, Ü. und Rigler, R.: „Photodynamic properties of green fluorescent proteins investigated by fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Chemical Physics* 250 (1999), S. 171–186.
- [49] Dyson, F.: „A meeting with Enrico Fermi“. In: *Nature* 427 (2004), S. 297.
- [50] Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A. und Hell, S. W.: „Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000), S. 8206–8210.
- [51] Leutenegger, M., Eggeling, C. und Hell, S. W.: „Analytical description of STED microscopy performance“. In: *Optics Express* 18 (2010), S. 26417–26429.
- [52] Finkler, B. et al.: „Monomolecular pyrenol-derivatives as multi-emissive probes for orthogonal reactivities“. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* 15 (2016), S. 1544–1557.
- [53] Agmon, N.: „Elementary Steps in Excited-State Proton Transfer“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 109 (2005), S. 13–35.

-
- [54] Vester, M.: „Antibunching und Protonentransfer: Abstandshaltende Photonen als Instrument chemischer Kinetik“. Dissertation. Universität des Saarlandes, 2016.
- [55] Kumpulainen, T., Bakker, B. H. und Brouwer, A. M.: „Complexes of a naphthalimide photoacid with organic bases, and their excited-state dynamics in polar aprotic organic solvents“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 17 (2015), S. 20715–20724.
- [56] Spies, C. et al.: „Solvent dependence of excited-state proton transfer from pyranine-derived photoacids“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 16 (2014), S. 9104–9114.
- [57] Rini, M., Pines, D., Magnes, B.-Z., Pines, E. und Nibbering, E. T. J.: „Bimodal proton transfer in acid-base reactions in water“. In: *The Journal of Chemical Physics* 121 (2004), S. 9593–9610.
- [58] Weller, A.: „Fast reactions of excited molecules“. In: *Progress in Reaction Kinetics and Mechanism* 1 (1961), S. 187–214.
- [59] Eigen, M., Kruse, W. und Maeyer, L.: „Über den Zustand des Protons (Hydroniumions) in Wässriger Lösung“. In: *Progress in Reaction Kinetics and Mechanism* 2 (1964), S. 285.
- [60] Vester, M., Grüter, A., Finkler, B., Becker, R. und Jung, G.: „Biexponential photon antibunching: recombination kinetics within the Forster-cycle in DMSO“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 18 (2016), S. 10281–10288.
- [61] Shankar, R.: *Principles of Quantum Mechanics*. 2. Aufl. Springer Science + Business Media, 1994.
- [62] Barrow, G. M.: *Physikalische Chemie*. 6. Aufl. Friedrich Vieweg & Sohn, 1984.
- [63] Wedler, G.: *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. 5. Aufl. Wiley-VCH, 2004.
- [64] Marian, C. M.: „Spin–orbit coupling and intersystem crossing in molecules“. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 2 (2012), S. 187–203.
- [65] Ringemann, C. et al.: „Enhancing Fluorescence Brightness: Effect of Reverse Intersystem Crossing Studied by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy“. In: *ChemPhysChem* 9 (2008), S. 612–624.
- [66] Diaspro, A., Chirico, G., Usai, C., Ramoino, P. und Dobrucki, J.: „Photobleaching“. In: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 3. Aufl. Springer Science + Business Media, 2006. Kap. 39.
- [67] Kearns, D. R. und Stone, A. J.: „Excited-State Intermolecular Interactions Involving Paramagnetic Molecules: Effect of Spin–Spin and Spin–Orbit Interactions on the Quenching of Triplets“. In: *The Journal of Chemical Physics* 55 (1971), S. 3383–3389.
- [68] Kikuchi, K. et al.: „New aspects of fluorescence quenching by molecular oxygen“. In: *Journal of the American Chemical Society* 115 (1993), S. 5180–5184.

- [69] Chmyrov, A.: „Photo-induced dark states in fluorescence spectroscopy – investigations & applications “. Dissertation. Stockholm: Royal Institute of Technology, 2010.
- [70] Marian, C. M., Etinski, M. und Rai-Constapel, V.: „Reverse Intersystem Crossing in Rhodamines by Near-Infrared Laser Excitation“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 118 (2014), S. 6985–6990.
- [71] Hell, S. W. und Kroug, M.: „Ground-state-depletion fluorescence microscopy: A concept for breaking the diffraction resolution limit“. In: *Applied Physics B* 60 (1995), S. 495–497.
- [72] Fölling, J. et al.: „Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return“. In: *Nature Methods* 5 (2008), S. 943.
- [73] Steinhauer, C., Forthmann, C., Vogelsang, J. und Tinnefeld, P.: „Superresolution Microscopy on the Basis of Engineered Dark States“. In: *Journal of the American Chemical Society* 130 (2008), S. 16840–16841.
- [74] van de Linde, S. et al.: „Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imaging“. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* 10 (2011), S. 499–506.
- [75] Braathen, L. R. et al.: „Guidelines on the use of photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer: An international consensus“. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 56 (2007), S. 125–143.
- [76] Weishaupt, K. R., Gomer, C. J. und Dougherty, T. J.: „Identification of Singlet Oxygen as the Cytotoxic Agent in Photo-inactivation of a Murine Tumor“. In: *Cancer Research* 36 (1976), S. 2326–2329.
- [77] Redmond, R. W., Kochevar, I. E., Krieg, M., Smith, G. und McGimpsey, W. G.: „Excited State Relaxation in Cyanine Dyes: A Remarkably Efficient Reverse Intersystem Crossing from Upper Triplet Levels“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 101 (1997), S. 2773–2777.
- [78] Johansson, L. B.-A.: „Limiting fluorescence anisotropies of perylene and xanthene derivatives“. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 86 (1990), S. 2103–2107.
- [79] Jablonski, A.: „Influence of Torsional Vibrations of Luminescent Molecules on the Fundamental Polarization of Photoluminescence of Solutions“. In: *Acta Physica Polonica* 10 (1950), S. 33–36.
- [80] Brink, D. und Satchler, G.: *Angular Momentum*. Oxford science publications. Clarendon Press, 1993.
- [81] McClain, M. W. und Harris, R. A.: „Two-Photon Molecular Spectroscopy in Liquids and Gases“. In: Bd. 3. Excited States. Academic Press, 1977. Kap. 1.

-
- [82] McClain, W. M.: „Excited State Symmetry Assignment Through Polarized Two-Photon Absorption Studies of Fluids“. In: *The Journal of Chemical Physics* 55 (1971), S. 2789–2796.
- [83] Quentmeier, S., Denicke, S., Ehlers, J.-E., Niesner, R. A. und Gericke, K.-H.: „Two-Color Two-Photon Excitation Using Femtosecond Laser Pulses“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 112 (2008), S. 5768–5773.
- [84] Wan, C. und Johnson, C. K.: „Time-resolved anisotropic two-photon spectroscopy“. In: *Chemical Physics* 179 (1994), S. 513–531.
- [85] Cruickshank, D. W. J. und Sparks, R. A.: „Experimental and Theoretical Determinations of Bond Lengths in Naphthalene, Anthracene and Other Hydrocarbons“. In: *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 258 (1960), S. 270–285.
- [86] Clar, E. und Mullen, A.: „Benzologues of Terrylene“. In: *Tetrahedron* 27 (1971), S. 5239–5245.
- [87] Huntress, W. T.: „Effects of Anisotropic Molecular Rotational Diffusion on Nuclear Magnetic Relaxation in Liquids“. In: *The Journal of Chemical Physics* 48 (1968), S. 3524–3533.
- [88] Favro, L. D.: „Theory of the Rotational Brownian Motion of a Free Rigid Body“. In: *Physical Review* 119 (1960), S. 53–62.
- [89] Filbrich, I.: „Diazoniumpayrenderivate“. Masterarbeit. Universität des Saarlandes, 2015.
- [90] *PicoHarp 300 User’s Manual and Technical Data*. PicoQuant GmbH.
- [91] Spies, C., Finkler, B., Acar, N. und Jung, G.: „Solvatochromism of pyranine-derived photoacids“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 15 (2013), S. 19893–19905.
- [92] Finkler, B. et al.: „Highly photostable “super”-photoacids for ultrasensitive fluorescence spectroscopy“. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* 13 (2014), S. 548–562.
- [93] Baraniuk, C.: *The number glitch that can lead to catastrophe*. 2015. URL: <http://www.bbc.com/future/story/20150505-the-numbers-that-lead-to-disaster>.
- [94] Agrawal, G.: *Nonlinear Fiber Optics*. Hrsg. von Agrawal, G. 5. Aufl. Optics and Photonics. Boston: Academic Press, 2013, S. 457–496.
- [95] Dudley, J. M., Genty, G. und Coen, S.: „Supercontinuum generation in photonic crystal fiber“. In: *Reviews of Modern Physics* 78 (2006), S. 1135–1184.
- [96] Pawley, J. B.: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 3. Aufl. Springer-Verlag US, 2006.

- [97] Wilhelm, S., Gröbler, B., Gluch, M. und Heinz, H.: *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie*. Techn. Ber. 2003.
- [98] Hell, S. W., Lindek, S., Cremer, C. und Stelzer, E. H. K.: „Measurement of the 4Pi-confocal point spread function proves 75 nm axial resolution“. In: *Applied Physics Letters* 64 (1994), S. 1335–1337.
- [99] Tanenbaum, A.: *Moderne Betriebssysteme*. 3. Aufl. Pearson Studium - IT. Pearson Deutschland, 2009.
- [100] Reichardt, J.: *Lehrbuch Digitaltechnik – Eine Einführung mit VHDL*. 2. Aufl. Oldenbourg Verlag, 2011.
- [101] Guasch, J. R., Weigand, R., Risueño, G. L. und Silvestrin, P.: „AGGA-4 – Core device for GNSS space-receivers of the next decad“. In: ESA Microelectronics, 2008.
- [102] Czerwinski, R. und Kania, D.: „Area and speed oriented synthesis of FSMs for PAL-based CPLDs“. In: *Microprocessors and Microsystems* 36 (2012), S. 45–61.
- [103] *PSD Picosecond Delayer OEM Manual*. 6. Aufl. Micro Photon Devices, 2015.
- [104] Pérez, J. et al.: „Super-Resolution in Plenoptic Cameras Using FPGAs“. In: *Sensors* 14 (2014), S. 8669–8685.
- [105] Kesel, F. und Bartholomä, R.: *Entwurf von digitalen Schaltungen und Systemen mit HDLs und FPGAs*. 2. Aufl. Oldenbourg Verlag, 2009.
- [106] *NI myRIO - Design Real Systems Fast*. National Instruments, 2013.
- [107] Balla, A. et al.: „The characterization and application of a low resource FPGA-based time to digital converter“. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 739 (2014), S. 75–82.
- [108] *Datenblatt BG39*. Schott.
- [109] O'Connor, D. V. und Phillips, D.: *Time-Correlated Single Photon Counting*. Academic Press, 1984.
- [110] Ugur, C., Bayer, E., Kurz, N. und Traxler, M.: „A 16 channel high resolution (<11 ps RMS) Time-to-Digital Converter in a Field Programmable Gate Array“. In: *Journal of Instrumentation* 7 (2012), S. C02004.
- [111] Kalisz, J.: „Review of methods for time interval measurements with picosecond resolution“. In: *Metrologia* 41 (2004), S. 17.
- [112] Wahl, M.: *Time-Correlated Single Photon Counting*. Techn. Ber. 2014.
- [113] Habenicht, A., Hjelm, J., Mukhtar, E., Bergstrom, F. und Johansson, L.: „Two-photon excitation and time-resolved fluorescence: 1. The proper response function for analysing single-photon counting experiments“. In: *Chemical Physics Letters* 354 (2002), 367–375.

-
- [114] Hollis, D. B.: „Review of hyper-Rayleigh and second-harmonic scattering in minerals and other inorganic solids“. In: *American Mineralogist* 73 (1988), S. 701–706.
 - [115] Luchowski, R. et al.: „Fluorescence Instrument Response Standards in Two-Photon Time-Resolved Spectroscopy“. In: *Applied Spectroscopy* 64 (2010), S. 918–922.
 - [116] Chib, R. et al.: „Standard reference for instrument response function in fluorescence lifetime measurements in visible and near infrared“. In: *Measurement Science and Technology* 27 (2016), S. 027001.
 - [117] Becker, W.: *The bh TCSPC Handbook*. 3. Aufl. 2008.
 - [118] Cova, S., Ghioni, M., Itzler, M., Bienfang, J. und Restelli, A.: *Single-Photon Generation and Detection: Chapter 4. Semiconductor-Based Detectors*. Experimental Methods in the Physical Sciences. Elsevier Science, 2013.
 - [119] Baker, G. A. und Brolley, J. E.: „Deconvolution of noisy experimental data“. In: *Journal of Computational Physics* 51 (1983), S. 227–240.
 - [120] Biktchantaev, I., Samartsev, V. und Sepiol, J.: „Spectroscopic properties and site origin of Shpol’skii system—terrylene in n-nonane“. In: *Journal of Luminescence* 98 (2002), S. 273–279.
 - [121] Kumar, A. V. A., Yashonath, S. und Chaplot, S. L.: „A study of the condensed phases and solid–solid phase transition in toluene: A Monte Carlo investigation“. In: *The Journal of Chemical Physics* 113 (2000), S. 8070–8079.
 - [122] Shallard-Brown, H. A., Watkin, D. J. und Cowley, A. R.: „n-Octanol“. In: *Acta Crystallographica Section E* 61 (2005), o213–o214.
 - [123] Wentzel, N. und Milner, S. T.: „Crystal and rotator phases of n-alkanes: A molecular dynamics study“. In: *The Journal of Chemical Physics* 132, 044901 (2010).
 - [124] Brocklehurst, B. und Young, R. N.: „Rotation of Perylene in Alkanes: Nonhydrodynamic Behavior“. In: *The Journal of Physical Chemistry* 99 (1995), S. 40–43.
 - [125] Penzkofer, A. und Sperber, P.: „Measurement of absorption cross sections in the long-wavelength region of the S0-S1 absorption band of dyes“. In: *Chemical Physics* 88 (1984), S. 309–313.
 - [126] Klar, T. A. und Hell, S. W.: „Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy“. In: *Optics Letters* 24 (1999), S. 954–956.
 - [127] Schrof, S. et al.: „STED nanoscopy with mass-produced laser diodes“. In: *Optics Express* 19 (2011), S. 8066–8072.
 - [128] Rittweger, E., Han, K. Y., Irvine, S. E., Eggeling, C. und Hell, S. W.: „STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution“. In: *Nature Photonics* 3 (2009), S. 144–147.

- [129] Arroyo-Camejo, S. et al.: „Stimulated Emission Depletion Microscopy Resolves Individual Nitrogen Vacancy Centers in Diamond Nanocrystals“. In: *ACS Nano* 7 (2013), S. 10912–10919.
- [130] Benniston, A. C., Matousek, P., McCulloch, I. E., Parker, A. W. und Towrie, M.: „Detailed Picosecond Kerr-Gated Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopy and Time-Resolved Emission Studies of Merocyanine 540 in Various Solvents“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 107 (2003), S. 4347–4353.
- [131] Haken, H. und Wolf, H. C.: *Molekülphysik und Quantenchemie*. 5. Aufl. Springer-Verlag Berlin, 2006.
- [132] Digman, M. A. und Gratton, E.: „Lessons in Fluctuation Correlation Spectroscopy“. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 62 (2011), S. 645–668.
- [133] Rüttinger, S. et al.: „Comparison and accuracy of methods to determine the confocal volume for quantitative fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Journal of Microscopy* 232 (2008), S. 343–352.
- [134] Benniston, A. C., Harriman, A. und McAvoy, C.: „Effect of resonance polarity on the rate of isomerization of merocyanine dyes“. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 94 (1998), S. 519–525.
- [135] Alarcon, E. et al.: „Photobehavior of merocyanine 540 bound to human serum albumin“. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* 9 (2010), S. 861–869.
- [136] Zhao, J., Wu, W., Sun, J. und Guo, S.: „Triplet photosensitizers: from molecular design to applications“. In: *Chemical Society Reviews* 42 (2013), S. 5323–5351.
- [137] Turton, D. A. und Wynne, K.: „Stokes–Einstein–Debye Failure in Molecular Orientational Diffusion: Exception or Rule?“ In: *The Journal of Physical Chemistry B* 118 (2014), S. 4600–4604.
- [138] Halasinski, T. M. et al.: „Electronic Absorption Spectra of Neutral Perylene (C₂₀H₁₂), Terrylene (C₃₀H₁₆), and Quaterrylene (C₄₀H₂₀) and Their Positive and Negative Ions: Ne Matrix-Isolation Spectroscopy and Time-Dependent Density Functional Theory Calculations“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 107 (2003), S. 3660–3669.